Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

Der mikrochemische Nachweis pflanzlicher Blausäureverbindungen

Eine neue mikrochemische Methode zum Nachweis von Cyanwasserstoff und Emulsin

Von

Hermann Brunswik

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien.
Nr. 174 der zweiten Folge

(Mit 1 Textfigur)

(Vorgelegt in der Sitzung am 1. Dezember 1921)

A. Einleitung.

1. Historisches. — Ziel der Arbeit.

Seit den Arbeiten des holländischen Botanikers M. Treub[1] über die physiologische Bedeutung des Vorkommens von Blausäure bei *Pangium edule* Reinw., *Phaseolus lunatus* u. a. ist das Interesse an dieser auch heute noch nicht abgeschlossenen Frage stets wachgeblieben. Die gleichzeitig einsetzenden chemisch-physiologischen Untersuchungen hauptsächlich englischer, französischer und italienischer Forscher haben einerseits die Konstitution vieler in der Pflanze vorkommender Blausäureverbindungen aufgeklärt, andrerseits ergab sich eine unerwartet weite Verbreitung dieser Stoffe bei den verschiedensten Familien und Gruppen des Pflanzenreiches. So kann bereits 1906 Greshoff[2] ungefähr 175 HCN-führende Arten angeben und die aus jüngster Zeit stammende Liste L. Rosenthaler's[3] umfaßt schon 360 Arten aus 41 Familien.

---

[1] M. Treub, Sur la localisation, le transport et le rôle de l'acide cyanhydrique dans le Pangium edule Reinw. Ann. d. Jardin Bot. de Buitenzorg, Vol. XIII, p. 1—89 (1895). — Nouvelles recherches sur le rôle de l'acide cyanhydrique dans les plantes vertes, I, II, III. Ann. d. Jardin Bot. de Buitenzorg, Ser. 2, Vol. IV, p. 86—147 (1905); Vol. VI, p. 79—106 (1907); Vol. VIII, p. 85—118 (1909).

[2] W. Greshoff, Über die Verteilung der Blausäure in dem Pflanzenreiche. Arch. d. Pharmazie, 1906, Bd. 244, p. 397—400, p. 665—672.

[3] L. Rosenthaler, Beiträge zur Blausäure-Frage. Schweiz. Apoth. Ztg., 1919, 57. Jahrg., p. 267 ff.

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

Diese Befunde scheinen immerhin für die von Treub aufgestellte Hypothese einer Bedeutung der Blausäure bei der Stickstoffassimilation zu sprechen, doch konnten gerade auf physiologischem Gebiete in den letzten zehn Jahren keine klärenden oder abschließenden Ergebnisse erzielt werden.

Im folgenden wurde nun versucht, zu prüfen, inwieweit es gelingt, die in der Pflanze gebildeten Blausäureverbindungen mikrochemisch nachzuweisen, da auf Grund einer in dieser Hinsicht ausgebildeten Methodik eine Erleichterung beim weiteren Aufdecken der Verbreitung dieser Verbindungen in der Pflanzenwelt und ihrer physiologischen Bedeutung zu erwarten ist.

2. Übersicht über die in der Pflanze vorkommenden Blausäureverbindungen.[1]

a) Die Blausäureglukoside.

Die cyanwasserstoffhältigen Körper, die bisher aus Pflanzen isoliert und eingehend studiert wurden, erwiesen sich alle als sogenannte »Blausäureglukoside«. Es ist dies eine Reihe von Verbindungen, die in ihrem Molekül außer dem Zuckerkomplex und einem aromatischen oder aliphatischen Aglykon noch ein Molekül Cyanwasserstoff HCN enthalten, das bei Hydrolyse mit verdünnten Säuren oder bei enzymatischer Spaltung (Emulsin) in Freiheit gesetzt wird.

Nach dem Vorgange von Greshoff[2] lassen sich die bisher bekannten Blausäureglukoside je nach der Beschaffenheit ihres Aglykons in drei getrennte Gruppen stellen:

1. Benzaldehydcyanhydringlukoside. Hieher gehören: Amygdalin $C_{20}H_{27}NO_{11}$ (2 Mol. Glukose + Benzaldehyd + HCN) sowie das nahezu identische Pterisamygdalin,[3] Laurocerasin (amorphes Amygdalin), die drei isomeren Glukoside Prulaurasin, Sambunigrin und Prunasin $C_{14}H_{17}NO_6$ (1 Mol. Glukose + Benzaldehyd + HCN; auch isomer mit dem Mandelsäurenitrilglukosid E. Fischer's), schließlich Vicianin $C_{19}H_{25}NO_{10}$ (1 Mol. Glukose + 1 Mol. Arabinose [Pentose] + Benzaldehyd + HCN), schon loser Dhurrin $C_{14}H_{17}NO_7$ (1 Mol. Glukose + Paraoxybenzaldehyd + HCN) sowie das noch nicht völlig aufgeklärte Corynocarpin, respektive Karakin.

2. Acetoncyanhydringlukoside. Zu diesen zählt das Linamarin, das nach Dunstan und Henry identisch ist mit dem von ihnen dargestellten Phaseolunatin $C_{10}H_{17}NO_6$ (1 Mol. Glukose + Aceton + HCN); auch das früher als

---

[1] Vgl. den ausführlichen Abschnitt in F. Czapek, Biochemie der Pflanze, 2. Aufl., III. Bd. (1921), p. 205—220.

[2] W. Greshoff, l. c., p. 665—672.

[3] W. Greshoff, Vorübergehende Anwesenheit von Blausäure im Farn. Ref. Chem. Zentralbl., 1908, II, p. 334. — Unterscheidet sich von Amygdalin nur durch seine größere Löslichkeit in Ätheralkohol.

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

eigenes Glukosid geführte Mannihotoxin (liefert bei der Spaltung Aceton + HCN) dürfte mit den genannten beiden völlig übereinstimmen. — Nahe verwandt mit diesen drei Glukosiden ist schließlich Gynocardin $C_{13}H_{19}NO_9$, das aus Glukose, HCN und einem nicht näher bekannten Diketon $C_6H_8O_1$ besteht.

3. Lotoflavincyanhydringlukoside. Diese interessante Gruppe, die ein Bindeglied zu den reinen, weit verbreiteten Flavonen darstellt, wird repräsentiert durch das von Dunstan und Henry studierte Lotusin $C_{28}H_{31}NO_{16}$ — spaltet in zwei Mol. Glukose, Blausäure und Lotoflavin $C_{15}H_{10}O_6$ (isomer mit Luteolin und Fisetin).

Schließlich ist eine große Zahl von Pflanzen bekannt, die ein HCN-abspaltendes Glukosid führen, dessen Konstitution noch nicht näher studiert wurde.[1] Die Zahl der Blausäureglukoside dürfte daher mit den eben angeführten bei weitem noch nicht erschöpft sein.[2]

b) Über die »lockere« Blausäurebindung.

In der botanischen Literatur über die Blausäurefrage findet sich bei zahlreichen Autoren (M. Treub, v. Romburgh, M. Dekker, A. W. de Jong, K. Peche, C. Ravenna, V. Babini, G. Bosinelli u. a. in den Jahren 1897 bis 1913) eine mehr oder minder scharf betonte Gegenüberstellung der oben angeführten, chemisch greifbaren Blausäureglukoside und einer »quasi-freien«, »labil-«, respektive »locker-gebundenen« oder gar »freien« Blausäure, die neben den »stabilen« Glukosiden in denselben Pflanzenorganen, besonders in den Blättern (speziell den jungen!), vorkommen soll.

Über die Art und Weise der »labilen« oder »lockeren« Bindung wurden nur Hypothesen geäußert (de Jong,[3] Peche[4]), chemisch isolierbar und analysierbar schienen die fraglichen Substanzen nicht zu sein.

In Anbetracht der Wichtigkeit, diese durch die verschiedensten Bezeichnungen einigermaßen in Verwirrung gebrachte und zudem noch teilweise hypothetische Frage zu klären, sollen die diesbezüglichen Angaben im folgenden kritisch zusammengestellt werden.

Das Vorhandensein von freier Blausäure in lebenden Zellen und Geweben im strengsten, wörtlichen Sinne erscheint höchst unwahrscheinlich und wurde in klarer Weise (nicht bloß als

---

[1] Vgl. E. Abderhalden, Biochem. Handlexikon, Bd. II. p. 720—722, Bd. VIII, p. 362—368.

[2] Über das jüngst entdeckte Hiptagin vgl. Czapek, l. c., III. Bd. (1921), p. 806.

[3] A. W. K. de Jong, Sur la présence d'acide cyanhydrique libre ou très faiblement combiné dans les feuilles du Pangium edule. Ann. d. Jard. d. Buitenzorg. 1908, Sér. 2, Vol. VII, p. 1—17. Ref. Just's Jahresbericht, 1908, 3. Bd., p. 550—553.

[4] K. Peche, Mikrochemischer Nachweis von Cyanwasserstoffsäure in Prunus Laurocerasus L. Sitzb. d. Akad. d. Wiss. in Wien, Bd. CXXI. Abt. I (1912), p. 15—16 (des Separatdr.).

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

verschwommener, mehr der chemischen Terminologie entsprungener Ausdruck) auch von niemandem behauptet. Die Wirkung geringster HCN-Konzentrationen auf die Assimilation (O. Warburg[1]) durch Hemmung der »Blackmann'schen Reaktion«, gedacht als eine Schwermetallkatalyse an Oberflächen, die hemmende Wirkung der Blausäure auf die pflanzliche Atmung (H. Schroeder[2]), die schädigenden Folgen gasförmig dargebotener HCN in relativ schwachen Konzentrationen auch bei sogenannten Blausäurepflanzen, wie sie zuletzt Jungmann[3] festgestellt hat, schließlich die überaus große chemische Reaktions- und Additionsfähigkeit von HCN und seine physikalischen Eigenschaften (Flüchtigkeit) erlauben wohl nur eine glatte Verneinung dieser Möglichkeit.

Anders liegen die Verhältnisse bei der »labilen« oder »lockeren« HCN-Bindung, deren Vorkommen etwa als Cyanhydrin an Aldehyd- oder Ketongruppen, wie Jong[4] sie z. B. bei *Pangium edule* und *Prunus javanica* annimmt, von vornherein als möglich zugegeben werden muß.

Treub, der in dieser Hinsicht jedenfalls die genauesten und ausgedehntesten Untersuchungen (1891 bis 1909) anstellte, unterscheidet in seinen zwei ersten Arbeiten (1895, 1905) streng glukosidisch gebundene HCN (bestimmbar nach längerer Mazeration des Materials in H_2O) und »quasi-freie« HCN, die schon bei der »distillation directe« (Übergießen des frischen Materials mit siedendem Wasser und sofortiges Destillieren) zu gewinnen ist und nicht glukosidischer Herkunft sein sollte. Gerade diese letztere konnte er mit seiner Berlinerblaumethode nachweisen. Angeregt durch die Methodik, die Guignard bei *Sambucus nigra* anwandte, vollführte Treub in seiner nächsten Arbeit (1907) die »distillation directe« durch Übergießen des frischen Materials mit kochendem absoluten Alkohol oder mit kochender 30%-Salzlösung (zirka 106° C.). Während durch Anwendung der Salzlösung von 106° die Menge der direkt abdestillierbaren HCN deutlich, aber gegenüber der mit reinem kochenden Wasser nur höchstens um die Hälfte herabgedrückt war, ergab die Destillation nach Übergießen mit kochendem absoluten Alkohol Werte, die sich bereits um eine ganze Dezimale von denen der früheren Methode unterschieden; eine scheinbare Ausnahme bildete nur *Pangium* sp. Treub[5] gestand auf Grund dessen zu, daß ein Teil der durch seine Methode (distillation directe) bestimmten »quasi-freien« HCN — trotz der Siedetemperatur — auf Grund rascher enzymatischer Spaltung der betreffenden Glukoside entstanden sei, dachte aber beim kochenden Alkohol nicht so sehr an eine raschere Enzym-Inaktivierung, als vielmehr an eine »spezifische Wirkung auf die Zellen« und hielt, besonders mit Rücksicht auf die Resultate bei *Pangium*, an der Existenz der labilen HCN-Bindung fest. — In seiner letzten Arbeit (1909) wirft Treub[6] neuerdings die Frage nach der Bindungs-

[1] O. Warburg, Theorie der Kohlensäureassimilation. Die Naturwissenschaften, 1921, IX. Jahrg., Heft 18. p. 354—358.

[2] H. Schroeder, Über den Einfluß des Cyankaliums auf die Atmung von Aspergillus niger etc. Jahrb. f. wiss. Botanik, 1907, Bd. 44. Heft 3. p. 409—481.

[3] W. Jungmann, Phys.-anatom. Untersuchungen über die Einwirkung von Blausäure auf die Pflanzen. Ber. d. deutsch. Bot. Gesellsch., 1921, 39. Jahrg., p. 84—88.

[4] de Jong, l. c. Vgl. auch Treub, l. c. (1909), p. 115.

[5] M. Treub, l. c. (1907), p. 97—98.

[6] M. Treub, l. c. (1909), p. 112—116.

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

art der Blausäure in der Pflanze auf[1] und äußert sich, besonders im Hinblick auf seine an *Prunus javanica* ausgeführten methodischen Experimente, schon folgendermaßen (l. c., p. 116): »Folglich scheint es, daß im allgemeinen die Wirkung der Blattenzyme auf die betreffenden Blausäureverbindungen nicht allein sehr energisch ist, sondern daß sie sich vor allem plötzlich (subitement) äußert, was ich früher nicht glaubte, annehmen zu können.... Ich lege Wert darauf, schon hier zu sagen, daß ich nun mehr und mehr von der Berechtigung der Ansicht Guignard's überzeugt bin, der immer die Glukoside als die absolut überwiegenden (absolument prédominant) HCN-Verbindungen nicht nur in den Samen, sondern auch in den Blättern angesehen hat.«

Damit schien, trotzdem Dekker[2] und de Jong[3] noch an Treub's alter Auffassung festhielten, die Frage durch Treub selbst schon geklärt.

Um so überraschender ist es, daß Peche[4] (1912) für *Prunus laurocerasus* L. neuerdings auf eine reichlich vorhandene »lockere« HCN-Bindung (alles, was durch das Mercuronitratreagens nachweisbar war), neben den beiden Glukosiden Prulaurasin und Laurocerasin, zurückgreift. Peche urteilt folgendermaßen: »Angenommen, die nachgewiesene Blausäure entstünde durch Enzymwirkung auf die Glykoside, dann müßte man Benzaldehyd und Zucker in denselben Zellen, die Blausäure enthalten, nachweisen können, was für den Benzaldehyd nicht der Fall ist. (Nicht bewiesen, da bis jetzt kein eindeutiges Reagens auf Benzaldehyd in der Pflanzenmikrochemie bekannt ist! Anm. d. Verf.) Daß aber eine Enzymwirkung geradezu ausgeschlossen ist, geht aus dem verschiedenen Intensitätsgrade des Blausäurenachweises in stark und minder belichteten Blättern hervor, während die Reaktion, da der Glykosidgehalt derselbe bleibt (? vom Verf.[5]), stets dieselbe Intensität zeigen müßte.«

Es hat den Anschein, als ob Peche sich hierbei nur auf die ersten Arbeiten Treub's stützte, während ihm die exakten Versuche Treub's, die gerade an dem mit seiner Versuchspflanze in allem so ähnlichen *Prunus javanica* ausgeführt wurden (1909),

---

[1] Vgl. l. c., p. 113. »... Est-il (HCN) engagé sous forme glucosidique ou non? Voilà surtout la question, qui se pose. Et, pratiquement, elle revient à une autre question, savoir: l'action enzymatique est-elle arrêtée, oui ou non, dans les conditions de l'expérience?«

[2] J. Dekker, Pharmac. Weekbl. 1906, Bd. 43, p. 942.

[3] de Jong, l. c. — Jong's Versuchsanstellung trachtet die Enzymwirkung durch niedere Temperaturen (abs. Alkohol von —10°) auszuschalten. Enzympräparate (immer schwächer als die nativen Enzyme!) erwiesen sich dabei tatsächlich als unwirksam. Bei ungepulverten, bloß zerschnittenen Blättern muß Jong zugeben, daß selbst durch dreistündigen Aufenthalt in Alkohol von —10° das Enzym in den Zellen noch nicht völlig unschädlich gemacht wurde. Dasselbe — nur in geringerem Maße — muß man für das gepulverte Material annehmen, aus dem Jong seine definitiven Werte zog.

[4] K. Peche, l. c., p. 15 (des Separatums).

[5] Bezieht sich wohl auf die Feststellung Verschaffelt's (1902), der aber den Glukosidgehalt nach der erzielbaren HCN bestimmte, also hier richtiger »Blausäuregehalt« zu setzen wäre, wodurch die ganze Argumentation hinfällig wird.

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

scheinbar entgangen sind. Die Annahme einer reichlichen lockeren HCN-Bindung bei *Prunus laurocerasus* ist experimentell durch nichts begründet und durch die erwähnten Experimente Treub's an *Prunus javanica* sehr unwahrscheinlich gemacht.

Auch Ravenna und seine Mitarbeiter[1] suchen 1912 den Gehalt an »freier« (gemeint wohl locker gebundener) HCN in den Organen verschiedener Blausäurepflanzen quantitativ festzustellen, gelangen aber bei Verfeinerung der Methodik (Tötung der Enzyme bei 110°) zu immer kleineren Mengen, wobei sie jedoch nach ihrer eigenen Ansicht die Möglichkeit nicht ausschließen können, daß während der Analysen das betreffende Glukosid infolge der raschen Wirkung der hydrolisierenden Enzyme gespalten worden sei.

Hält man die genau durchgeführten Versuche Treub's aus den Jahren 1907 bis 1909 mit den letztgenannten Resultaten zusammen, so gelangt man zur Überzeugung, daß es auch eine »locker gebundene« HCN in Wirklichkeit überhaupt nicht gibt, da bei fortschreitender Methodik (bei möglichst wirksamer Enzyminaktivierung) die Menge der aus frischen Blättern gewinnbaren HCN immer verschwindender wird. Daß sie nicht gänzlich auf Null gebracht werden kann (und nur diese experimentelle Tatsache ließ Treub zurückschrecken, diese letzte Folgerung zu ziehen), läßt sich durch die ungezwungene Annahme erklären, daß Glukosid und Enzym in diesen Fällen in denselben Zellen, wenn auch im Leben räumlich auseinandergehalten, vorkommen und bei den bisher verwendeten — und wohl auch bei allen möglichen — Methoden die Zellen stets um einen Augenblick früher getötet werden, Glukosid und Enzym daher eher miteinander in Berührung kommen, als die Inaktivierung des Fermentes erfolgen kann. Durch diese Koexistenz von einem HCN-Glukosid und einem rasch wirkenden Ferment[2] — wie sie auch in anderen Fällen angenommen wird — ist das scheinbare Vorkommen der »lockeren« HCN-Bindung gerade bei saftreichen und jugendlichen Organen (Blätter) im Gegensatz zu den trockeneren Samen, sowie die Verschiedenheiten bei den einzelnen Methoden direkter Destillation und beim mikrochemischen Nachweise verständlich.

Bereits Czapek[3] scheint einer ähnlichen Überzeugung zu sein, indem er die ganze Frage mit den Worten abtut: »Freie Blausäure kommt meist nur in sehr geringer Menge in der Pflanze vor; überall handelt es sich um enzymatische

---

[1] C. Ravenna und V. Babini, Sulla presenza dell'acido cianidrico libero nelle piante. Rend. Accad. Linc. Roma, Vol. XXI (1912), p. 540—547. Ref. Just's Jahresbericht, 41. Jahrg., 1913, p. 1420. — C. Ravenna und G. Bosinelli, Sulla presenza ... etc. Nota III. Rend. Accad. Linc. Roma, vol. XXI (1912), p. 355—358. Ref. Just's Jahresbericht, 41. Jahrg., 1913, p. 1420.

[2] Dieser Standpunkt findet sich schon angedeutet von Pfeffer, Handb. d. Pflanzenphysiologie, 1. Aufl. (1881), I. Bd., p. 307, für Amygdalin-Emulsin in den bitteren Mandeln, wo er aber als nicht zutreffend fallen gelassen werden mußte.

[3] F. Czapek, Biochemie der Pflanzen, 2. Aufl., 3. Bd. (1921), p. 205.

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

Abspaltung derselben bei der Präparation unter dem Einfluß von Enzymen vom Typus des Mandelemulsins....«

Die Wichtigkeit dieses Gegenstandes jedoch, gerade in physiologischer Hinsicht und bei der Beurteilung mikrochemisch gewonnener Resultate, ließen es trotzdem angebracht erscheinen, die Literatur hierüber eingehender vorzuführen und selbst hierzu Stellung zu nehmen.

Wenn demnach im weiteren dieser Untersuchung noch von einer »lockeren« HCN-Bindung gesprochen wird, so sind dabei stets jene Verhältnisse gemeint, die durch das Zusammenvorkommen der bekannten Blausäureglukoside mit einem sehr wirksamen Ferment gegeben sind und die durch die heutige Methodik nicht näher aufgelöst werden können.

B. Mikrochemischer Nachweis der Blausäure (HCN).

I. Allgemeiner mikrochemischer HCN-Nachweis.

In der allgemeinen, respektive technischen Mikrochemie scheint nur ein geringes Bedürfnis nach einer Reihe brauchbarer Blausäurereaktionen bestanden zu haben. Sowohl Emich[1] wie Behrens[2] führen einzig die Berlinerblauprobe an, die ja, begleitet von der Geruchsdiagnose, bei nicht zu geringen Materialmengen, hinreichend ist.

Im Hinblick auf das häufige Vorkommen natürlicher Blausäureverbindungen, die durch enzymatische Prozesse leicht HCN abspalten, untersuchte ich sämtliche bei der makrochemischen, qualitativen Analyse gebräuchlichen Blausäurereaktionen auf ihre Verwertbarkeit in der Mikrochemie. Die hierbei erzielten Resultate sollen im folgenden dargestellt werden, während die Anwendbarkeit der einzelnen Reaktionen für botanische Zwecke erst nachher kurz zusammengefaßt werden wird.

1. Nachweis der Blausäure als Silbercyanid.

Blausäure und die löslichen Cyanide geben mit Silbernitrat einen weißen, amorphen Niederschlag von Silbercyanid [Cyansilber, $AgCN$, respektive $Ag^{\cdot}(Ag(CN)_2)'$]. Im Gegensatze zu dem in vielem sehr ähnlichen $AgCl$ bleibt Cyansilber am Lichte unverändert oder bräunt sich höchstens. In einer heißen Lösung von Na_2CO_3 oder K_2CO_3 etwas löslich, scheidet es sich aus diesen beim Erkalten krystallinisch, und zwar in feinen Nadeln ab (Bloxam[3]). In Wasser und verdünnten Säuren (bis zu 50 % HNO_3 in der Kälte) ist Cyansilber unlöslich, während NH_3 und Cyankalium

[1] Fr. Emich, Lehrbuch der Mikrochemie, 1911, p. 145.

[2] W. Behrens, Tabellen zum Gebrauch bei mikroskopischen Arbeiten, 1908, p. 160. — H. Behrens-Kley, Mikrochemische Analyse, 1915, 1. Teil, p. 180—181 und p. 184.

[3] Ch. L. Bloxam, Chem. News, Bd. 50, p. 155. Ref. Jahresber. d. Fortschr. d. Chemie, Bd. 37a, 1884/I, p. 475.

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

lösend wirken unter Bildung des komplexen $AgCN.NH_3$, respektive Kaliumsilbercyanid. In konzentrierter heißer $AgNO_3$-Lösung oder bei Einwirkung konzentrierter HNO_3 bildet sich aus Cyansilber ein Silbercyannitrat, das in langen, weißen, glänzenden Nadeln (luft- und alkohol-, aber nicht wasserbeständig) krystallisiert und dem Bloxam[1] die Formel $AgCN.2\,AgNO_3$ zuschreibt. — Konzentrierte HCl verwandelt Cyansilber in Chlorsilber, obwohl ersteres das unlöslichere ist.

Infolge dieser Eigenschaften wird schon seit langem Silbernitrat zur Titration blausäurehältiger Destillate verwendet.[2] Als qualitatives Blausäurereagens hat Silbernitrat besonders wegen der schwereren Unterscheidbarkeit von AgCl und AgCN in der Makrochemie nur geringe Bedeutung gewonnen.

Auch bei qualitativen mikrochemischen Untersuchungen bietet der direkte Zusatz von Silbernitrat keine Vorteile. Der etwa auftretende amorphe Niederschlag im untersuchten Tropfen müßte erst durch seine Unlöslichkeit in verdünnter HNO_3 und seine Eigenschaften nach dem Umkrystallisieren mit Ammoniak näher bestimmt und besonders gegenüber AgCl scharf unterschieden werden.

Weitaus besser läßt sich Silbernitrat unter Ausnützung des niederen Siedepunktes von Blausäure (26° C.) im hängenden Tropfen als eindeutiges HCN-Reagens verwenden.

a) Silbernitrat im hängenden Tropfen.

Die Reaktion läßt sich am besten in derselben Anordnung durchführen, die Molisch[3] für den Ammoniumnachweis empfohlen hat. Auf den Objektträger wird ein gut anschließender, 3 bis 7 *mm* hoher Glasring[4] aufgelegt; in die so entstandene Kammer gelangt die zu prüfende Substanz. Das Ganze wird mit einem Deckgläschen bedeckt, an dessen Unterseite ein mäßig großer Tropfen einer 1%-Silbernitratlösung hängt.

1. Reaktionsverlauf. Enthält die Probe freie Blausäure — die der meisten Cyanide kann durch Ansäuern mit verdünnter H_2SO_4 oder HNO_3 (nicht HCl!) in Freiheit gesetzt werden —, so entsteht in der abgeschlossenen Glaskammer schon bei Zimmertemperatur eine Blausäureatmosphäre, die, da um 7% leichter als

---

[1] Ch. L. Bloxam, l. c., und Chem. News, Bd. 48, p. 154. Ref. Jahresber. d. Fortschr. d. Chemie, 1883. Bd. 36 a, p. 472.

[2] Vgl. W. Treadwell, Lehrbuch der analytischen Chemie. I. Bd. (Qualit. Analyse), 9. Aufl., 1918, p. 309. — II. Bd. (Quantit. Analyse), 6. Aufl., 1913, p. 284—286 und p. 604—606.

[3] H. Molisch, Mikrochemie der Pflanze. 2. Aufl., 1921, p. 65.

[4] Um jeden etwaigen Verlust an HCN zu vermeiden, benützte ich zumeist Glaskammern mit fixem Boden von 5 *mm* Höhe und 14 *mm* Durchmesser (leicht herstellbar durch entsprechendes Absprengen des Endteiles der »Apothekergläschen«).

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

Luft, langsam aufsteigt und vom hängenden Silbernitrattropfen absorbiert wird. In kurzer Zeit bildet sich in diesem eine — oft schon makroskopisch sichtbare — weißliche Trübung, die sich bei mikroskopischer Betrachtung meist als ein Gewirr kleinerer und größerer feinster Nadeln[1] von Silbercyanid erweist (Fig. 1, *a*). Die allmähliche Bildung (zuerst am Tropfenrand, dann auch in der Tropfenkuppe) und Verdichtung des Cyansilberniederschlages läßt sich mit dem Mikroskop gut verfolgen. — Da der Siedepunkt von HCN bei 26° liegt, genügt schon ein ganz vorsichtiges und kurzes Anwärmen über dem Mikrobrenner, um die Reaktion bei Spuren von Blausäure zu beschleunigen.

Fig. 1.

a) Nadeln, Ranken und Drusen von Silbercyanid, im hängenden Tropfen entstanden. — *b)* Schachturmartige Krystalle von Silbercyannitrat. — *c)* Silbercyanid umkrystallisiert in NH_3: Kleeblattformen. — *d)* Silbercyanid, mit heißer 50%-HNO_3 umkrystallisiert; feine Nadeln und Nadelbüschel. — Vergr. 285.

2. Krystallform. — Optisches Verhalten von Silbercyanid. Die so entstehenden Krystalle sind äußerst charakteristisch und bei einer gewissen HCN-Konzentration völlig identisch mit den durch Umkrystallisieren von amorphem Silbercyanid in heißem K_2CO_3 erhaltenen Krystallnadeln. Wenn auch die Krystallform je nach der Schnelligkeit und Menge der absorbierten HCN etwas schwankt (sind nur Spuren von HCN vorhanden und erfolgt ihr Freimachen sehr langsam, so bilden sich relativ große, kompakte Krystalle oder Sphärite in der Randzone des Tropfens), so sind sie doch stets gut ausgebildet; nur in einer sehr konzentrierten Blausäureatmosphäre, z. B. beim Halten eines Reagenstropfens über die Öffnung eines Behältnisses von altem Cyankalium, entstehen weniger schöne Krystalle, die einigermaßen

[1] In der Ausbildung charakteristischer Ag CN-Krystalle — durch diese Versuchsanordnung ermöglicht — liegt der Vorteil dieser Methode.

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

zusammenbacken. — Im polarisierten Lichte leuchten die Silbercyanidkrystalle auf und zeigen eine gerade Auslöschung. Es ist dies — nebst Krystallform und Lichtbeständigkeit — ein brauchbares Unterscheidungsmerkmal gegenüber den tesseralen, bei gekreuzten Nicols in allen Lagen dunkel bleibenden Krystallen von AgCl.

3. Bildung von Silbercyannitrat $AgCN.2AgNO_3$. Wird Silbercyanid in heißer, konzentrierter $AgNO_3$-Lösung oder in konzentrierter Salpetersäure gelöst, so gelingt, wie schon Wöhler (1824) und Bloxam[1] feststellten, beim Erkalten die Abscheidung von Silbercyannitrat $2AgNO_3.AgCN$. Dieses Doppelsalz[2] krystallisiert in langen, weißen, glänzenden Nadeln, die an der Luft sehr beständig sind, sich nicht schwärzen und sich ohne Zersetzung mit Alkohol waschen lassen; beim Eintragen in H_2O überziehen sie sich sofort mit AgCN, ohne sich völlig zu lösen.

Läßt man einen Reagenstropfen, in dem sich auf die beschriebene Weise Silbercyanidkrystalle gebildet haben, an der Luft eintrocknen, so bemerkt man nach einiger Zeit, wenn nur mehr geringe Flüssigkeitsmengen übrig sind, daß die Cyansilberkrystalle unter Einwirkung der so entstandenen konzentrierten Lösung von $AgNO_3$ oder, wenn alles Silber verbraucht, infolge der konzentrierten HNO_3 in schöne, stark lichtbrechende prismatische Krystalle umkrystallisieren, die nichts anderes darstellen als das vorerwähnte Silbercyannitrat $AgCN.2AgNO_3$. Bei Zusatz von Wasser erscheinen diese Krystalle augenblicklich wie angenagt, mit körniger Oberfläche, bleiben jedoch weiterhin unverändert (unter dem Schutz des gleich gebildeten AgCN). — Daß die Bildung mikrochemisch kleiner Mengen des Doppelsalzes bloß durch konzentrierte $AgNO_3$-Lösung, respektive konzentrierte HNO_3 oder beider zugleich auch ohne Erwärmung (wie bei der makrochemischen Darstellung) vor sich geht, erscheint nicht weiter verwunderlich.

Da sich, wie oben bereits angeführt, AgCN in konzentriertem wässerigen $AgNO_3$ einigermaßen löst, so kann die Konzentration des Reagens ($AgNO_3$) nicht ohne Einfluß auf die Empfindlichkeit der Reaktion und auf die erscheinende Krystallform von AgCN sein.

In der Tat ließ sich dies durch Versuche bestätigen. Während — bei gleichmäßig gebotener HCN-Menge — in sehr stark verdünnten (bis über 1%) $AgNO_3$-Lösungen Cyansilber als ein schönes Nadelgewirr ausfiel, entstanden in verdünntem (3 bis 5%-) Silbernitrat üppige Nadeln und Ranken von AgCN, bei ziemlich konzentrierten Silbernitratlösungen schließlich war das Erscheinen der Krystalle wesentlich verzögert, dafür traten aber wohl ausgebildete prismatische oder schachturmartige, stark lichtbrechende Einzelkrystalle auf, die schon in reinem Wasser und in verdünnter HNO_3 scheinbar braun und wie angenagt wurden, ohne ihre Gestalt zu ändern oder sich wahrhaft zu lösen — ohne Zweifel also bereits das früher beschriebene Silbercyannitrat waren (Fig. 1, *b*).

---

[1] Ch. L. Bloxam, l. c. (1883 und 1884).

[2] Vgl. Friedheim-Gmelin-Kraut, Handbuch der anorganischen Chemie, 7. Aufl., 1914, Bd. V, Abt. 2, p. 152.

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

In allen Fällen kann man demnach eine 1%-Lösung von Silbernitrat als Reagens verwenden, wobei weder eine Verzögerung des Ausfallens von AgCN, noch die Bildung von $AgCN.2AgNO_3$ eintritt.

4. Eindeutigkeit der Reaktion. — Die Reaktion kann als vollständig eindeutig bezeichnet werden. Schon allein der Umstand, daß nur gasförmige Körper in Reaktion treten können, schließt die meisten anderen Substanzen aus. Ähnlich verhalten sich nur HCl-Dämpfe und Rhodanwasserstoff (Thiocyanwasserstoff), weshalb die Unterschiede zwischen AgCN gegenüber AgCl (Chlorsilber) und AgCNS (Rhodansilber) näher festgestellt werden sollen.

a) Silberchlorid AgCl. — Silberchlorid entsteht auch im hängenden Tropfen, selbst bei sehr langsamem Freiwerden und Abdunsten von HCl, jedoch niemals gut krystallisiert wie AgCN, sondern nur als amorpher Niederschlag, der erst durch Umkrystallisieren mit NH_3 in die bekannten tesseralen Krystalle übergeführt werden kann. Sie unterscheiden sich von den auf dieselbe Art erzielten AgCN-Krystallen: 1. durch ihre Gestalt [AgCl: Würfel, Oktaeder, kreuzförmige oder ordenssternartige Bildungen — AgCN: die beschriebenen Nadeln und Nadelaggregate, nach dem Umkrystallisieren mit NH_3 meist knollig-kugelige Bildungen oder Kleeblattformen (Fig. 1, *c*)]; 2. durch ihr Verhalten im Licht; die AgCl-Krystalle werden in kurzer Zeit blau, dann violett bis schwarz durch die zersetzende Wirkung des Tageslichtes, während die AgCN-Krystalle als praktisch lichtunempfindlich zu bezeichnen sind; 3. durch ihr Verhalten im polarisierten Licht; die tesseralen Chlorsilberkrystalle erscheinen in allen Lagen dunkel, die von Cyansilber leuchten bei gekreuzten Nicols stark auf, zeigen gerade Auslöschung und die sphäritischen Bildungen (Kugel- und Kleeblattformen) das »Brewster'sche« Kreuz; 4. durch die verschiedene Löslichkeit in konzentrierter HNO_3. Während AgCl und AgCN mit ihrer Löslichkeit in Ammoniak, Cyankalium und Natriumthiosulfat übereinstimmen, lassen sie sich durch konzentriertes HNO_3, besonders in der Wärme, gut unterscheiden. AgCl wird selbst durch rauchende Salpetersäure nicht angegriffen, AgCN löst sich unter Deckglas bereits beim vorsichtigen Erwärmen mit einer zirka 60%-HNO_3 bis knapp an den Siedepunkt und fällt, bei nicht zu geringen Mengen, während des Erkaltens in zarten Nadeln und dichten Nadelbüscheln wieder aus. (Eine gute Kontrollreaktion dafür, ob wirklich Cyansilber vorliegt! Fig. 1, *d*).

O. Brunck[1] hat zuletzt diese Verhältnisse makrochemisch eingehend geprüft und fand, daß Silbercyanid in kalter, verdünnter HNO_3 auch in frisch gefälltem, fein verteiltem Zustand ganz unlöslich[2] ist; bei höherer Temperatur, namentlich

[1] O. Brunck, Die Cyanverbindungen des Silbers und Kupfers in der Gewichtsanalyse. Ber. d. Deutsch. chem. Ges., 34. Jahrg., II. Bd., p. 1604—1609.

[2] Das Silbernitratreagens kann deshalb mit verdünnter HNO_3 angesäuert werden (bis zu einem Gehalt von 10% HNO_3), ohne daß Reaktionszeit und Krystall-

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

in der Siedehitze und bei stärkeren Salpetersäurekonzentrationen findet eine umkehrbare Reaktion statt: $AgCN + HNO_3 \rightleftarrows AgNO_3 + HCN$, wobei HCN teilweise in der Flüssigkeit verbleibt und beim Erkalten Silber neuerdings feinflockig fällt.

Auf Grund der angeführten Unterschiede ist eine Unsicherheit, ob AgCl oder AgCN im hängenden Tropfen vorliegt, wohl ausgeschlossen, ja man kann sogar Chlor und Blausäure in einem Silbernitrattropfen zugleich nebeneinander nachweisen, wie sich z. B. aus den später zu schildernden Versuchen mit Tabakrauch ergibt.

Daß selbst sehr stark verdünnte HCl bei genügender Reaktionsdauer durch diese Methode auf das Silbernitrat im hängenden Tropfen einwirkt, zeigt folgender Versuch:

In drei Glaskammern werden je 4 Tropfen einer 2%-Oxalsäure gebracht: hierauf werden in die eine von ihnen 5 Tropfen 1·2%-KCl-Lösung, in die andere 5 Tropfen einer 10%-NaCl-Lösung, in die dritte Kochsalz in Form einiger Körnchen hinzugefügt und alle drei mit einem hängenden Silbernitrattropfen abgeschlossen. Nach 16 Stunden ist in allen drei hängenden Tropfen ein feinkörniger Niederschlag zu beobachten (und zwar in einer, der verwendeten Chlorkonzentration proportionalen Menge), der mit NH_3 vorsichtig umkrystallisiert, die typischen, am Licht sich bald schwärzenden Krystalle von AgCl liefert. Von der in den angeführten Systemen (Alkalichlorid-Oxalsäure) teilweise entstehenden Salzsäure sind daher deutlich nachweisbare Mengen abgedunstet und vom Silbernitrat absorbiert worden.

Bei der Untersuchung von chloridhaltigen Proben auf HCN (respektive Cyanide) wird daher beim Ansäuern mit H_2SO_4 oder selbst mit einer schwachen organischen Säure stets — bei längerer Expositionsdauer — auch etwas HCl in Reaktion treten, vermag aber — nach der angeführten deutlichen Unterscheidbarkeit von AgCl und AgCN — die Eindeutigkeit der Reaktion keineswegs in Frage zu stellen.[1]

β) Silberrhodanid AgSCN. Nicht so leicht läßt sich Rhodansilber vom Cyansilber unterscheiden. Beim Abdunsten von Rhodanwasserstoff (Siedepunkt bei 85° C., also bedeutend höher als der von HCN) bildet sich AgSCN an der Oberfläche des hängenden Tropfens in Form von Nadeln oder Körnchen, so daß die Krystallform und das optische Verhalten (leuchtet ebenfalls im polarisierten Lichte auf) keine klaren Unterschiede gegenüber AgCN

---

form nachteilig beeinflußt würden. Blausäure ließe sich daher eventuell mit Vorteil zum mikrochemischen Silbernachweis heranziehen. Wenn hierbei infolge der geringeren Molekülgröße von AgCN die Empfindlichkeit der von Erich Bayer (Über eine neue Rubidium[Cäsium]-Silber-Goldverbindung und ihre Verwendung zum mikrochemischen Nachweis von Gold, Silber, Rubidium und Cäsium. Sitzber. d. Akad. d. Wiss. Wien, math.-naturw. Kl., Abt. II b, 1920, 129. Bd., p. 243) in jüngster Zeit vorgeschlagenen Reaktion auch nicht erreicht werden dürfte, so steht dem die Einfachheit des verwendeten Reagens (aufsteigende HCN-Dämpfe) für den praktischen Gebrauch gegenüber.

[1] Bei den pflanzlichen HCN-Verbindungen, die nur durch Fermentation bei neutraler Reaktion Blausäure abspalten, fällt dieser Umstand sogar völlig weg (vgl. p. 24).

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

bietet. In bezug auf ihre Lichtbeständigkeit halten die Ag SCN-Krystalle etwa die Mitte zwischen Ag Cl und Ag CN.

Ein gutes Unterscheidungsmerkmal gegenüber Ag CN ist nur die Unlöslichkeit in konzentrierter (über 60%) HNO_3, während Ag CN, wie bereits erwähnt, durch 60% HNO_3 in der Wärme leicht umkrystallisiert werden kann.

Ag SCN ist jedoch in einer konzentrierten $AgNO_3$-Lösung (1 Gewichtsteil H_2O — 2 Gewichtsteile $AgNO_3$) beim Erhitzen unter Deckglas beträchtlich löslich und beim Erkalten krystallisiert das Doppelsalz $2\,AgNO_3 . AgSCN$ (Silbernitrat-Silberrhodanid) in schönen, durchsichtig glänzenden Prismen, vier- oder sechseckigen Tafeln aus, die lichtbeständig sind und mit Alkohol (96%) ohne Schaden gewaschen werden können. Setzt man dem Deckglasrand etwas Wasser zu, so werden die Krystalle sofort braun, erscheinen wie angenagt, doch das oberflächlich gebildete Ag SCN verhindert die weitere schnelle Zersetzung des Doppelsalzes, so daß die Krystalle auch im Überschuß von Wasser oder in verdünnter HNO_3 ungelöst bleiben.

Noch viel ratsamer ist es jedoch, die Gegenwart, respektive die Abwesenheit von Thiocyanwasserstoffsäure und der Rhodanide durch die bekannte[1] Reaktion mit bis zur Farblosigkeit verdünntem Eisenchlorid [Bildung des blutroten Eisenrhodanids $Fe(SCN)_3$] sicherzustellen. Es kann dies entweder durch direktes Zusetzen von stark verdünntem $FeCl_3$ zum angesäuerten Probetropfen geschehen oder falls dies aus irgendeinem Grunde untunlich, mit $FeCl_3$ im hängenden Tropfen, eventuell gleich am selben Objektträger, neben dem Tropfen des 1%-Silbernitratreagens.

Bei letztgenannter Versuchsanstellung kann noch die Rhodanwasserstoffsäure, die beim Zusammenbringen von drei Tropfen einer 0·01%-Rhodanammonlösung (1 : 10.000) mit einem Tropfen verdünnter HNO_3 oder H_2SO_4 entsteht und abdunstet, in Form einer deutlich gelbroten Färbung im hängenden $FeCl_3$-Tropfen nachgewiesen werden (Reaktionszeit höchstens 20 Minuten).

Auch Silberrhodanid ist demnach durch verschiedene Methoden von Ag CN gut und einfach zu unterscheiden.

γ) Entstehung eines Silbercarbonates. Bei der Anwendung der Reaktion auf die verschiedensten Objekte stieß ich in zwei Fällen — bei der Prüfung von frischem menschlichen Speichel (rein oder mit starkem Chloroformzusatz verwendet) und bei der Analyse von frisch zerriebenen Wasserasseln — auf die Bildung schöner gelblicher Krystalle, Drusen oder Sphärite im hängenden $AgNO_3$-Tropfen. Die Natur dieser Krystalle ließ sich in annähernder Weise leicht feststellen. Schon in ganz schwacher HNO_3 lösten sich die genannten Krystalle blitzschnell (Gegensatz zu Ag CN, Ag Cl, Ag SCN!), in 20% Essigsäure und in konzentrierter HCl verschwanden sie sehr rasch unter Gasblasenentwicklung und es hinterblieben bei Anwendung von Essigsäure einige kleine gelbliche Körnchen (wohl beigemischtes Silberoxyd), bei Zusatz von konzentrierter HCl Pseudomorphosen von Ag Cl, wie sich durch Umkrystallisieren mit NH_3 ergab. Es ist demnach nicht zweifelhaft, daß es sich hierbei um ein Silbercarbonat handelt. Der menschliche Speichel enthält bekanntlich bedeutende Mengen von CO_2 (bis 67 Volumprozent der Gase), teils direkt auspumpbar, teils aus Bicarbonatbindung allmählich freiwerdend. Diese Kohlensäure wird vom hängenden Tropfen langsam absorbiert, ebenso wie die aus dem

[1] Vgl. F. Emich, l. c., p. 146.

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

frisch angeriebenen, partiell weiteratmenden Wasserasselbrei. — Auch Wiener Leitungswasser, das mit durchgeblasener Atemluft (4% CO_2) gesättigt wurde, und mit Atemluft gefüllte Seifenblasen lieferten in der Glaskammer — wenn auch langsamer — im hängenden $AgNO_3$-Reagens Krystalle und Sphärite vom selben chemischen Verhalten. Eine Verwechslung dieses Silbercarbonates mit Silbercyanid erscheint wohl ausgeschlossen.

5. Empfindlichkeit der Reaktion. — Da Silbercyanid noch unlöslicher ist als AgCl, ist auch die Empfindlichkeit der Reaktion eine beträchtliche. Es läßt sich auf die angegebene Weise noch die Blausäure von einer Cyankaliumlösung **1:400.000** (= 0·00025%) eindeutig aus $^1/_{16}$ *cm*³ (1 Normaltropfen) nachweisen, was einer HCN-Verdünnung von **1:1,000.000** (= 0·0001%) entspricht, das sind **0·06** γ (Mikrogramm) HCN in einem Normaltropfen gelöst.[1] Benützung eines kleinen, niedrigen Glasringes sowie rasches Hantieren beim Ansetzen der Reaktion, respektive beim Säurezusatz erhöhen die Empfindlichkeit der Reaktion, die mit jener der bekannten Chlorreaktion mit $AgNO_3$ zu vergleichen ist. Behrens[2] gibt für sie als Empfindlichkeitsgrenze 0·05 γ an.

Infolge dieser Empfindlichkeit ist bei der Durchführung der Reaktion noch auf einige Umstände zu achten.

Während der größte Teil der Proben in reiner Luft, in einem Raum ohne Gasleitung und Gashahn durchgeführt wurde, arbeitete ich gelegentlich neben einem Tag und Nacht geheizten Paraffinofen. Es zeigte sich hierbei, daß zur Kontrolle aufgestellte Leerproben (leere Glaskammer mit $AgNO_3$ im hängenden Tropfen) in Spuren positiv auf HCN reagierten. Wie die folgenden Versuche zeigen, muß die Luft durch etwas ausströmendes Leuchtgas verunreinigt gewesen sein (»Laboratoriumsluft«).

Das Rohleuchtgas enthält bekanntlich Cyanwasserstoff und andere Cyanide in größerer Menge. Diese Stoffe werden beim Gasreinigungsprozeß großenteils zurückgehalten, nichtsdestoweniger enthält das Leuchtgas von Wien derzeit noch beträchtliche Mengen von Blausäure, wie aus folgenden Versuchen hervorgeht.[3]

1. Läßt man Leuchtgas gegen einen Tropfen des Silbernitratreagens ausströmen, so ist dieser nahezu im Augenblick von einer Kruste von Silbercyanidkrystallen (Nadeln) überdeckt. — Schöne Krystalle sind erst in einiger Entfernung von der Gasquelle (d. i. bei geringerer Konzentration) erzielbar.

2. In einen $1^1/_2$ *l*-Kolben wird durch 3 Sekunden Leuchtgas mit einem Schlauch eingeleitet. Nach $^1/_2$ Stunde offenen Stehens dieses Kolbens ist mit dem

---

[1] Nach G. Anderson, [Prüfung der wichtigsten Methoden zum qualitativen Nachweis der Blausäure, Ztschr. f. analyt. Chem., 55. Bd. (1916), p. 459—468], ist die makrochemische Empfindlichkeitsgrenze bei einer Konzentration von 0·0001% KCN erreicht (nur als Opaleszenz in 12 *cm* hoher Schicht gegen schwarzes Glanzpapier erkennbar) — ist demnach nur $2^1/_2$mal größer als die Mikroreaktion in der geschilderten Anordnung. Auch die Nachprüfung von J. M. Kalthoff (Über den Nachweis und die Bestimmung kleiner Mengen Cyanwasserstoff, Ztschr. f. analyt. Chem., 57. Bd., 1918, p. 1—15) ergab eine praktische Empfindlichkeit von 0·00025% KCN im Liter, stimmt also mit den von mir gefundenen Mikroempfindlichkeitsgrenzen gut überein.

[2] H. Behrens-Kley, l. c., p. 172.

[3] Nach der Analyse des städtischen Gaswerkes Wien enthält 1 *m*³ Reingas 16—20 *mg* HCN.

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

Geruchssinn kein Leuchtgas mehr in ihm festzustellen. Trotzdem tritt, wenn man den Hals des Kolbens mit einer Glasplatte abschließt, die 1% Silbernitrat im hängenden Tropfen trägt, in diesem im Verlauf von zirka 10 Minuten deutliche HCN-Reaktion ein.

Außer durch Leuchtgas ist die Luft jedoch auch häufig durch Tabakrauch verunreinigt und kann somit das Reaktionsergebnis auch dadurch beeinflußt werden. Schon seit langem ist das Vorhandensein von Blausäure im Tabakrauche behauptet worden und durch die Arbeiten von Toth[1] sowie von Lehmann und Gundermann[2] wurden die quantitativen Verhältnisse übereinstimmend sichergestellt, wenn auch die Frage noch offen blieb, ob im Tabakrauch primär Dicyan $(CN)_2$ enthalten sei (Toth) oder ob gleich Cyanwasserstoff entsteht (Lehmann).

Durch folgende Versuche läßt sich der Blausäuregehalt des Tabakrauches mikrochemisch leicht nachweisen:

1. Da nach den Feststellungen von Lehmann[2] in der Mundhöhle des Rauchers etwa die Hälfte der Cyanverbindungen zurückgehalten werden, wurde zuerst der Reagenstropfen (1% $AgNO_3$ neutral oder mit HNO_3 schwach angesäuert) zwischen Zigarette und Raucher eingeschaltet.

Eine etwas größere Glaskammer (20 *mm* Durchmesser, 14 *mm* Höhe) mit einem für den $AgNO_3$-Tropfen bestimmten heraushebbaren Glasplättchen am Boden derselben wird mit einem doppelt durchbohrten Kautschukstöpsel gut verschlossen. Durch die eine Bohrung wird ein Glasröhrchen derart eingesetzt, daß an das freie Ende mit einem Kautschukschlauch die Zigarette angesetzt werden kann, während das andere Ende in der Glaskammer knapp oberhalb des Reagenstropfens am Boden mündet; in die andere Bohrung wird ein nur wenig in die Glaskammer hineinreichendes Glasröhrchen eingefügt, an dessen rechtwinkelig abgekricktem Ende der Raucher zu saugen hat. Das Röhrchen zwischen Zigarette und Kammer wird mit Baumwolle leicht angefüllt, so daß sich die zahlreichen Teerprodukte des Rauches daran niederschlagen, ohne daß der Zug darunter leidet.

Wird eine halbe oder auch nur eine Viertelzigarette an dem Tropfen in der Glaskammer vorbeigeraucht, so ist derselbe von einer dicken, braunglänzenden Kruste überzogen, die als solche nicht günstig zur weiteren Untersuchung ist. (Doch manchmal sind unter ihr bereits charakteristische Nadeln von AgCN zu finden.) Wird diese aber mit 50% HNO_3 unter Deckglas bis zum sachten Sieden erwärmt, so geht alles bis auf die gebildeten AgCl-Krystalle (nur ein kleiner Bruchteil; Lehmann fand makrochemisch auf ähnliche Weise 5 bis 20% Chlorsilber neben Cyansilber!) in Lösung und beim Erkalten des Präparates fällt reichlich Cyansilber in den beschriebenen Einzelkrystallen, Nadeln und

---

[1] Julius Toth, Über die im Tabakrauch enthaltenen Cyanverbindungen. Chem. Ztg., 34. Bd. (1910), p. 298—299 und p. 1357. — Über die Cyanverbindungen des Tabakrauches. Chem. Ztg., 35. Bd. (1911), p. 1262.

[2] K. B. Lehmann und K. Gundermann, Neue Untersuchungen über die Bedeutung der Blausäure für die Giftigkeit des Tabakrauches. Archiv f. Hygiene, 76. Bd. (1912), p. 38—115.

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

Nadelbüscheln aus (vgl. Fig. 1, *d*). Hiermit sind Cyanverbindungen und HCl im Tabakrauch zugleich nachweisbar. Rhodanide konnten beim Vorbeirauchen von einer ganzen Zigarette an einem angesäuerten $FeCl_3$-Tropfen nicht nachgewiesen werden, was mit Lehmann's auf anderem Wege gewonnenen Ergebnissen übereinstimmt.

2. Die geschilderte Methode ist für die Empfindlichkeit des verwendeten Blausäurereagens eigentlich noch zu roh; es fallen ganz bedeutende Mengen von AgCN aus. — Bläst man in einen $^1/_4$ *l*-Erlmeyerkolben einen schwachen Zug Zigarettenrauch, verstopft die Mitte des Halses mit einem lockeren Wattebäuschchen (zur Abhaltung der Teerprodukte) und bedeckt die Öffnung des Gefäßes mit einem Objektträger, der 1% neutrales oder schwach angesäuertes $AgNO_3$ im hängenden Tropfen trägt, so entsteht alsbald (5 Minuten) eine schwache Kruste, die sich, wie bei Versuch 1, durch Umkrystallisieren mit heißer 50%-HNO_3 in AgCN und AgCl scheiden läßt. Auch mit NH_3 kann die Kruste in Krystallform übergeführt werden. Ein zweites und drittes Sublimat von einem solchen Erlmeyerkolben enthält ebenfalls noch nachweisbare AgCN-Mengen, da HCN erst langsam emporsteigt.

3. In einem großen Zimmer ($5 \times 6 \times 4^1{}_2$ *m*) werden drei Zigaretten hintereinander normal geraucht. Von vier am Tisch in der Mitte des Zimmers exponierten Reagenstropfen, über Wasser derart hängend, daß seitlich die Rauchluft ungehindert hereindiffundieren kann, reagierten drei überhaupt nicht auf HCN, auch nicht nach 3 Stunden; nur der vierte hängende Tropfen, der knapp neben der beim Rauchen benützten Aschentasse aufgestellt war, lieferte deutliche AgCN-Krystalle.

Blausäure (respektive Dicyan) ist demnach noch in einem ausgeblasenen Zuge von Tabakrauch leicht direkt mikrochemisch nachweisbar, gegen eine mäßige Tabakrauchatmosphäre ist das Reagens jedoch normalerweise nicht mehr empfindlich.

Immerhin zeigen die angeführten Versuche, daß man sich bei mikrochemischer Untersuchung auf Blausäure nach der beschriebenen Methode vor Verunreinigung der Luft mit Tabakrauch und besonders mit Leuchtgas zu hüten hat. Kontrolleerversuche können vor Fehlschlüssen bewahren.

b) Färbbarkeit der Silbercyanidkrystalle.

In jüngster Zeit wurde vom Verfasser[1] gezeigt, daß Silberchloridkrystalle beim Umkrystallisieren mit Ammoniak durch Zusatz geeigneter organischer Farbstoffe (Methylenblau, Eosin, Bismarckbraun) während ihres Entstehens echt zu färben sind. — In ähnlicher Weise gelingt dies auch mit den Cyansilberkrystallen. Naturgemäß konnten auch hier nur ammoniakbeständige Farbstoffe

[1] H. Brunswik, Über die Färbbarkeit der Silberchloridkrystalle mit organischen Farbstoffen. Zeitschr. f. wiss. Mikroskopie etc., 38. Bd. (1921), p. 150—152.

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

verwendet werden. Die beim Umkrystallisieren von Ag CN mit NH_3 erzielten Resultate sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt; der erhaltene Farbton, da nicht immer identisch mit dem des Farbstoffes, sowie die Beeinflussung des Krystallhabitus,[1] unter sonst gleichen Bedingungen, wurden jeder Rubrik beigefügt, ebenso — vergleichsweise — die nach derselben Methode erzielten Färbungsergebnisse bei Ag Cl (Silberchlorid) und Ag SCN (Silberrhodanid).

Das Umkrystallisieren läßt sich bei Ag CN nur im unbedeckten Tropfen durchführen, da das zuerst entstehende Silberammoniumcyanid nur bei Luftzutritt das NH_3 wieder abgibt und so Silbercyanid zum Ausfallen gelangen kann.

Sämtliche als positiv angegebenen Krystallfärbungen sind homogen und als »echt« zu betrachten; sie sind völlig beständig gegen Waschen mit Wasser, Alkohol, 20 % Essigsäure, 20 bis 40 % kalter Salpetersäure etc.

Doch nicht nur beim Umkrystallisieren mit NH_3, sondern auch bei dem eben geschilderten Blausäurenachweis mit $AgNO_3$ kann man gefärbtes Silbercyanid sofort im hängenden Tropfen erzielen, indem man dem Silbernitratreagens ein wenig Methylenblau zusetzt. Bei genügend schwacher Farbkonzentration (der hängende Tropfen soll wasserblau sein) sind die entstehenden Körnchen, Nadeln, Ranken, Drusen oder Sphärite von Ag CN zart, aber deutlich blaugrün gefärbt.

Eosin, Bismarckbraun, Patentblau und Nigrosin flocken mit dem Elektrolyten $AgNO_3$ aus und können daher für diesen Zweck nicht verwendet werden. Orange G. kann zwar dem Silbernitrat ohne Schaden zugesetzt werden, beeinflußt aber die Krystallform von Ag CN nicht günstig und die erzielte Färbung (orange-rötlichbraun) besitzt im Gegensatz zu der mit Methylenblau für die mikroskopische Beobachtung zu wenig Tinktionskraft.

Die Beigabe von Methylenblau zu dem 1 %-Silbernitratreagens wurde von mir fast stets durchgeführt, da sie sich als sehr vorteilhaft erwies. Besonders bei Anwendung der Reaktion auf pflanzliche und tierische Objekte (HCN- und Emulsinnachweis) können die manchmal auftretenden Körnchen, Decken oder Krusten von reduziertem Silber (Silberspiegel) sowie die mit Chloroform übergehenden Verunreinigungen auf den ersten Blick von den stets schön blaugrün gefärbten Silbercyanidkrystallen unterschieden werden.

Im Jahre 1894 sagte O. Lehmann[2] in der Schlußbemerkung zu seiner Arbeit über künstliche Färbung von Krystallen: »Die Möglichkeit, Krystalle zu färben und die auftretenden Unterschiede

---

[1] Eine derartige, durch Farbstoffe als Lösungsgenossen bewirkte Strukturstörung der Krystalle, die bis zur völligen Auffaserung führen kann, beobachtete schon O. Lehmann (Wied. Ann. d. Physik u. Chemie, Neue Folge. Bd. 51 (1894), p. 68—70).

[2] O. Lehmann, l. c., p. 76.

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

Übersicht über die Färbbarkeit der Krystalle von Ag CN, Ag Cl und Ag SCN.

Farbstoff	Färbt Ag CN	Bewirkt als Krystallform	Färbt Ag Cl	Färbt Ag SCN
Bismarckbraun	† (dunkelgelb)	Knollen	†	†
Boraxkarmin	† (rosaviolett)	Knollen	0	0
Brasilin	0		0	—
Eosin wässerig	† (leuchtend rot)	Strahlensterne — Knollen	† (!)	†
Fluoreszin	† (gelbrot)	Strahlensterne — Knollen	†	0
Indigokarmin	0	—	0	—
Kongorot	0	—	† (!) *	0
Methylenblau	† (blaugrün)	Kleeblattformen, Knollen	† (!)	†
Naphthol-schwarz	0	—	0	—
Nigrosin	† (violett)	zerfasert, feinste, zart lila gefärbte Krystalltrichite	† (zerfasert jedoch leicht)	0
Orange G.	† (rotorange)	Kleeblattformen. Knollen	0 (sehr lichtempfindliche farblose Einzelkrystalle	0
Patentblau	† (grünlich)	strahlige Sphärite, Doppelpinsel, Knollen	† (!)	0 (?)

Zeichenerklärung: † färbt echt und dilut, 0 färbt nicht, — nicht untersucht.

* Die Färbbarkeit von Ag Cl mit Kongorot ist dadurch von Bedeutung, daß sie selbst nach dem Kochen mit konzentrierter HNO_3 völlig unverändert bleibt, während der Farbstoff selbst schon bei einer Spur freier Säure in Blau umschlägt und ausflockt. Eine bloße Adsorption und Speicherung des Kongorot an die gut ausgebildeten Einzelkrystalle ist demnach ausgeschlossen, wie sie z. B. der Verfasser an den Chitosansalzsphäriten (Über die Mikrochemie der Chitosanverbindungen, Biochem. Ztsch., 113. Bd., 1921, p. 117) nachweisen konnte, wo das Kongorot in den Sphäriten bei Säurezusatz in Blau umschlägt.

Die Färbung mit Kongorot (und Nigrosin) gelingt nur bei sehr geringem Farbzusatz und langsamem Abdunsten des NH_3 (unter einer Uhrschale z. B.), sonst tritt eine völlige Ausfaserung des Krystallhabitus ohne Farbstoffaufnahme ein, wie es in meiner diesbezüglichen Mitteilung (l. c., p. 151) angegeben wurde.

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

bei veränderter Wahl von Farbstoff und Krystall dürften für analytische Zwecke, insbesondere für die Krystallanalyse, in manchen Fällen großen Nutzen gewähren. Man wird auch vielleicht imstande sein, aus einem Gemisch von Farbstoffen, einen durch eine krystallisierte Substanz zu isolieren....« Diese Hoffnungen haben sich bisher nicht verwirklicht, der Ausbau der Krystallfärbungsfrage geriet seit 1900 — trotz des Aufschwunges von theoretischer und angewandter Mikrochemie — ins Stocken und ihre Ergebnisse waren, wie die gelegentlichen Hinweise von Emich,[1] Molisch[2] und Tunmann[3] dartun, für die Mikrochemie bisher von keiner praktischen Bedeutung. — Wenn auch im vorliegenden Falle die Färbung des Silbercyanids im hängenden Tropfen nichts für die Reaktion wesentliches bedeutet, so bietet deren Durchführung doch gewisse Vorteile für die praktische Handhabung und darum möge sie, im Sinne Lehmann's, empfohlen sein.

2. Nachweis der Blausäure mittels Mercuronitrat.

Blausäure und lösliche Cyanide reagieren mit Mercuronitrat nach folgender Gleichung:

$$2\,KCN + Hg_2(NO_3)_2 = 2\,KNO_3 + Hg(CN)_2 + Hg;$$

es entsteht demnach das in Lösung verbleibende Mercuricyanid und metallisches Quecksilber.

Peche[4] hat diese Reaktion in die Mikrochemie eingeführt und zum lokalisierten Nachweis der »locker gebundenen« Blausäure im Gewebe von *Prunus Laurocerasus* L. benützt.

Doch läßt sich Mercuronitrat (1 bis 3 %) auch mit Vorteil zum rein qualitativen Nachweis von Cyanwasserstoff in ganz analoger Weise wie Silbernitrat (vgl. p. 8) bei Benützung einer Glaskammer im hängenden Tropfen verwenden. Die Bildung der kleinen Quecksilberkügelchen, ihre Ansammlung und teilweise Vereinigung an der tiefsten Stelle des Tropfens sowie das teilweise Sublimieren des Hg in die Umgebung des Reagens läßt sich mit dem Mikroskop schrittweise verfolgen. Auch hier gelingt die Reaktion besser bei schwächeren HCN-Konzentrationen, indem sich größere Quecksilbertropfen bilden.

Unter den geschilderten Versuchsbedingungen (selbsttätiges Überdestillieren der HCN bei Zimmertemperatur), demnach bei Vermeidung des direkten Zusetzens von $Hg_2(NO_3)_2$ zum Untersuchungstropfen, der ja auch andere reduzierende Substanzen enthalten könnte, ist die Reaktion wohl vollkommen eindeutig. Ihre

---

[1] F. Emich, l. c., p. 123—124; p. 143, 148, 174.

[2] H. Molisch, l. c., p. 55 u. 61.

[3] O. Tunmann, Pflanzenmikrochemie, 1913, p. 74, p. 109 und p. 114.

[4] K. Peche, l. c., p. 4—6.

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

Empfindlichkeit steht jedoch der mit Silbernitrat bedeutend nach: es konnte HCN noch aus einer Cyankaliumlösung 1 : 5.000 (0·02 %) nachgewiesen werden, was einer Blausäureverdünnung von 1 : 12.000 (0·0083 %) entspricht. Der Grund hiefür dürfte in der teilweisen Flüchtigkeit des sich an der Grenzfläche von Tropfen und Atmosphäre bildenden Hg zu suchen sein. Wenn also der Nachweis von HCN als Silbercyanid auch 80mal empfindlicher ist als der mit Mercuronitrat, so wird letzterer trotzdem, falls es sich nicht um Spuren von Blausäure handelt, herangezogen werden können.

3. Nachweis der Blausäure mittels Benzidin-Kupferacetat.

Abgesehen von den spezifischen Blausäureproben (Berlinerblaureaktion, Rhodanreaktion, in gewissem Sinne auch die Proben mit Silbernitrat, Mercuronitrat, Pikrinsäure-Soda etc.) ist noch eine Reihe von Farbenreaktionen bekannt, welche infolge ihrer großen Empfindlichkeit, trotzdem sie nicht völlig eindeutig sind, als Vorproben in der makrochemischen Analyse verwendet werden.[1]

Sie beruhen alle darauf, daß Blausäure in Gegenwart von Cuprisalzen oxydierend wirkt und dadurch verschiedene farblose Substanzen in ihre gefärbten Oxydationsprodukte umgewandelt werden. In dieser Weise werden Guajakharz-$CuSO_4$, Aloin-$CuSO_4$, alkalische Phenolphtalinlösung verwendet und in neuerer Zeit hat Moir[2] Hydrocoerulignon-Kupferacetat, respektive Benzidin-Kupferacetat empfohlen.

Da die beiden letztgenannten Reagentien sich durch ihre Haltbarkeit und große Empfindlichkeit auszeichnen und dem Behrens'schen Prinzip der »Krystallfällung« entsprechen, so erschienen sie für mikrochemische Untersuchungen sehr geeignet. Leider war ich nicht in der Lage, mir Hydrocoerulignon ($C_{10}H_{18}O_6$ — ein Diphenylderivat; Empfindlichkeit 1 : 5,000.000!) zu verschaffen; die Anwendung von Benzidinacetat-Kupriacetat ergab jedoch sehr günstige Resultate.

a) Reagens. Als Reagens wurde in Anlehnung an die Angaben von Pertusi und Gastaldi[3] ein Gemisch von folgenden Substanzen verwendet: 1 cm^3 3 %-Kupriacetatlösung, 10 cm^3 gesättigte Benzidinacetatlösung und 16 cm^3 reines Wasser. Das Reagens hat — in dickerer Schicht — eine schwachgelbgrüne Färbung und ist einige Zeit haltbar.

b) Reaktionsverlauf und Beschaffenheit des Reaktionsproduktes. Um die Eindeutigkeit der Reaktion einigermaßen zu erhöhen (vgl. Punkt *c*) wurde auch in diesem Falle die Probe in der Glaskammer mit dem Reagens im hängenden Tropfen durch-

[1] Vgl. auch L. Rosenthaler, Der Nachweis organischer Verbindungen. Stuttgart 1914, p. 492—495.

[2] J. Moir, New sensitive test for hydrocyanic acid. Proc. Chem. Soc. May 1910, 14. Bd., p. 115. Ref. Pharmaceutical Journal, Bd. 84 (1910), p. 759.

[3] C. Pertusi und E. Gastaldi, Neue allgemeine Methode zum Nachweis der Blausäure. Chem. Ztg., Jahrg. 37 (1913), p. 609—610.

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

geführt, die leichte Verdampfung freier, respektive freigemachter Blausäure schon bei Zimmertemperatur wie in den beiden vorher beschriebenen Reaktionen benützend.

Infolge der durch das Kuprisalz vermittelten Oxydationswirkung der absorbierten Blausäure entstehen im hängenden Tropfen bei geringer HCN-Konzentration schöne blaue, nadelförmige Krystalle, während bei größeren HCN-Mengen eine mehr einheitliche Decke ultramarinblauer Körnchen und Nädelchen entsteht. Die chemische Natur dieses krystallisierten, wasserunlöslichen Oxydationsproduktes des Benzidins ist noch nicht völlig aufgeklärt: es ist jedenfalls völlig analog dem sogenannten »Benzidinchromat«, das bei Einwirkung von Chromaten und Bichromaten auf Benzidin allein entsteht (vgl. die diesbezügliche Untersuchung von Willstätter und Piccard[1]) und das auch unter diesem Namen zum mikrochemischen Nachweis von Chromsäure mit Vorteil herangezogen wurde,[2] analog auch dem »Benzidinferricyanid« (Moir-Barzilowsky), das aus Benzidin und Ferricyaniden direkt entsteht und das von Behrens[3] zum mikrochemischen Nachweis der Ferri- und Ferrocyanwasserstoffsäure (Trennung durch Chinolin) verwendet wurde. Nach den Untersuchungen von Schlenk und Knorr[4] handelt es sich in allen diesen Fällen um die entsprechenden meri-Diphenochinondiimoniumsalze (auf 1 Mol. Imin 1 Mol. Amin und 2 Äquivalente Säure enthaltend), die ihre lebhafte Färbung der chinoiden Bindung verdanken.

In auch nur schwachen Säuren oder Alkalien werden diese krystallisierten blauen Verbindungen zerstört, wie schon Madelung[5] festgestellt hat.

Im polarisierten Lichte leuchten die größeren Krystallnadeln auf, zeigen eine gerade Auslöschung und Pleochroismus.

c) Eindeutigkeit der Reaktion. — Benzidin allein liefert entsprechende blaue Oxydationsprodukte mit Ferricyaniden, Chromaten, Bichromaten, Permanganaten, Perjodaten, Persulfaten, Platinchlorid, Goldchlorid, Eisenchlorid; Wasserstoffsuperoxyd-Peroxydasen, Ozon, Oxyhämoglobin. — Nur bei Gegenwart von Cupriacetat geben nach Pertusi's[6] Untersuchungen Bromide (sehr langsam), Jodide, Cyanide, Ferrocyanide und Rhodanide die betreffenden blauen Oxydationsverbindungen des Benzidins.

---

[1] R. Willstätter und Jean Piccard, Über meri-Chinon-imine II. Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. (Berlin), 1908, 41. 2 Bd., p. 3245—3252.

[2] Vgl. hierzu H. Behrens, Anleitung z. mikrochem. Analyse, 2. Aufl., 1899, p. 102. — H. Behrens-Kley, l. c., p. 89. — F. Emich, l. c., p. 100.

[3] H. Behrens-Kley, l. c., p. 180—181.

[4] W. Schlenk und Aug. Knorr, Über chinoide Biphenylderivate. Lieb. Annalen d. Chemie, 1908, Bd. 363, p. 313—339.

[5] W. Madelung, Über stark gefärbte holo- und meri-chinoide Imoniumsalze des Benzidins etc. Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. (Berlin), 1911, 44. 1 Bd., p. 626—631.

[6] C. Pertusi und E. Gastaldi, l. c., p. 609.

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

Durch die angegebene Versuchsanstellung werden freilich die meisten dieser Substanzen, da sie nicht gasförmig oder flüchtig sind, ausgeschaltet. Nur Ozon, Jod (Brom) und Rhodanwasserstoffsäure verhalten sich identisch wie Cyanwasserstoff. HSCN kann, ebenso wie bei der Reaktion mit $AgNO_3$ (vgl. p. 13) durch einen beigegebenen zweiten hängenden Tropfen von verdünnter $FeCl_3$ sichergestellt werden, Jod und eventuell Brom durch einen ebensolchen von Stärkekleister, so daß die Reaktion mit Benzidin-Kupferacetat in der dargestellten mikrochemischen Anordnung doch als hinreichend eindeutig gegenüber Blausäure bezeichnet werden kann, um brauchbare Resultate zu liefern. In der Praxis wird man trotzdem diese Reaktion wohl nie allein, sondern in Verbindung mit dem Silbercyanidnachweis (zwei hängende Tropfen nebeneinander in einer Glaskammer) anwenden, wobei sich die Eindeutigkeit der Probe mit $AgNO_3$ und die noch größere Empfindlichkeit (vgl. Punkt *d*) des Benzidinreagens in bester Weise ergänzen.

Für die in ihrem Wesen sehr verwandte HCN-Reaktion Schönbein's mit Guajaktinktur-$CuSO_4$ wird von Anderson[1] und Kolthoff[2] — anscheinend nicht unabhängig voneinander — angegeben, daß sie in ihrem Werte dadurch geschmälert sei, daß »auch indifferente Stoffe, wie Ammoniak und Zigarrenrauch« den positiven Ausfall der Reaktion bewirkten. Für das Benzidin-Kupferacetatreagens gilt dies von NH_3, wie ich mich überzeugte, jedoch keineswegs. Zigarrenrauch kann aber — wie bereits früher eingehend dargestellt wurde — gegenüber einem Blausäurereagens nicht als »indifferenter Stoff« bezeichnet werden. Der Umstand, daß Zigarrenrauch regelmäßig HCN oder Cyanide in nachweisbaren Mengen enthält, scheint den beiden genannten Autoren entgangen zu sein.

Die von mir zum Nachweis von HCN im Leuchtgas und Zigarettenrauch angestellten Versuche (vgl. p. 14 und p. 15) gelingen bei Verwendung des Benzidinreagens an Stelle des 1%-Silbernitrates, der gesteigerten Empfindlichkeit entsprechend, noch wesentlich besser, so daß auch hierbei stets beide Proben gleichzeitig ausgeführt wurden.

d) Empfindlichkeit der Reaktion. — Wie bereits erwähnt, ist die Empfindlichkeit des Benzidin-Kupferacetatreagens eine bedeutende; aus einem Normaltropfen einer 0·00008%-KCN-Lösung (1 : 1,250.000) erfolgt nach dem Ansäuern noch deutlich positive Reaktion im hängenden Tropfen (blaue Einzelnadeln, besonders am Tropfenrand). Dies entspricht einer HCN-Konzentration von 1 : 3,000.000, respektive 0·02 γ HCN im Normaltropfen. Die Reaktion ist daher noch dreimal empfindlicher als diejenige mit Silbernitrat im hängenden Tropfen, für eine biologische Anwendung, wo es sich meist um sehr geringe HCN-Mengen handelt, deshalb besonders geeignet.

---

[1] G. Anderson. l. c. (1916), p. 467.

[2] J. M. Kolthoff. l. c. (1918), p. 15.

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

4. Übersicht über die mikrochemischen HCN-Reaktionen.

Auch die übrigen gebräuchlichen Blausäureproben wurden auf ihre mikrochemische Verwertbarkeit geprüft. Doch weder die sonst so empfindliche Rhodanreaktion (Liebig), noch die von allen Autoren übereinstimmend als recht unempfindlich und wenig brauchbar bezeichnete Probe mit Pikrinsäure-Soda, noch andere erwiesen sich als mikrochemisch mit einigem Vorteil anwendbar, so daß auf die diesbezüglichen Untersuchungen nicht näher eingegangen werden soll.

Zu der in der Mikrochemie bereits lange geübten Blausäurereaktion durch Bildung von Berlinerblau direkt im Lösungstropfen können demnach zwei Reaktionen in der Glaskammer mit Silbernitrat, respektive Benzidin-Kupferacetat im hängenden Tropfen gestellt werden, die an Einfachheit der Handhabung und Empfindlichkeit[1] erstgenannte noch übertreffen und zur Anwendung auf biologische Objekte durch die Möglichkeit, Spuren erst langsam entstehender HCN zu summieren, besonders geeignet erscheinen.

II. Mikrochemischer HCN-Nachweis in Anwendung auf pflanzliche Objekte.

1. Rein qualitativer Nachweis.

Man kann wohl sagen, sämtliche Befunde über ein neues Vorkommen von HCN in der Pflanze, sei es als Glukosid, sei es in locker gebundener, noch nicht näher bekannter Form, wurden bisher auf Grund makrochemischer Analyse gewonnen. Guignard[2] z. B., der eine große Zahl blausäureführender Pflanzen entdeckte, verwendete bei seinen Untersuchungen gewöhnlich 100 *g* des betreffenden frischen Gewächses, nur in seltenen Fällen bloß 10 *g*.

Die Vorteile, welche eine mikrochemische qualitative Untersuchung von pflanzlichen Objekten auf Blausäure bietet, liegen auf der Hand; nebst Material- und Zeitersparnis ist es der Umstand, daß die oft erheblichen Individual- und Altersschwankungen im HCN-Gehalte einer bestimmten Art bei Untersuchung eines Blattfragmentes, eines kleinen Rinden- oder Stengelstückchens oder einiger Samenquerschnitte, also gerade erst durch die mikrochemische Methode aufgedeckt werden (vgl. Beispiel I bis III im folgenden).

In der Tat eignen sich einige der im vorhergehenden beschriebenen Reaktionen zum Nachweis von HCN in geringen Mengen

---

[1] Empfindlichkeit der Berlinerblauprobe nach Behrens-Kley (l. c., p. 189): 0·07 γ CN, Empfindlichkeit des Nachweises mit Silbernitrat: 0·06 γ HCN, desjenigen mit Benzidin-Kupferacetat: 0·02 γ HCN. — Eine »Geruchsdiagnose« ist bei solchen Größenordnungen völlig unmöglich!

[2] L. Guignard, Sur l'éxistence, dans certains grosseilliers, d'un composé fournissant de l'acide cyanhydrique. Compt. rend., 141. Bd. (1905/2), p. 448—452; Nouveaux exemples de Rosacées à acide cyanhydrique. Compt. rend., 143. Bd. (1906/2), p. 451.

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

pflanzlicher Objekte, und zwar sowohl der glukosidisch wie der »locker« gebundenen. Da sämtliche dieser Mikro-Blausäurereaktionen in der Glaskammer mit dem Reagens als hängender Tropfen ausgeführt werden müssen, können sie nur zum qualitativen Nachweise benützt werden, sind also in ihrer Bewertung der Mikrosublimation gleichzustellen, die in letzter Zeit in der Pflanzenmikrochemie und bei der Beurteilung von Drogen etc. immer häufiger angewendet wird.

Am geeignetsten für Pflanzenmaterial sind die beiden empfindlichsten Proben, nämlich die mit $AgNO_3$-Methylenblau im hängenden Tropfen (p. 8) und die mit Benzidin-Kupferacetat (p. 20). Da letztgenanntes Reagens zwar noch empfindlicher ist als $AgNO_3$, aber nicht als völlig eindeutig erscheint, benütze ich entweder nur Silbernitrat-Methylenblau oder beide Reagentien zugleich, tropfenweise nebeneinander hängend. — In die Glaskammer mit fixem Boden (14 *mm* Durchmesser, 6 *mm* Höhe) gelangt etwas von dem Pflanzenmaterial. Glukosidisch gebundene HCN wird beim Befeuchten der fein zerschnittenen Objekte durch die stets gleichzeitig vorhandenen Fermente (Emulsin, Phaseolunatase, Linase etc.) in meist kurzer Zeit in Freiheit gesetzt, während bei der »lockeren« HCN-Bindung (z. B. bei *Prunus laurocerasus*) ein möglichst rasches Einbringen der frischen, unbefeuchteten Schnitte genügt.

Die Zeit der fermentativen Mazeration, die bis zum Freiwerden der Blausäure aus den betreffenden Glukosiden verstreicht, ist bei den einzelnen Pflanzen eine wesentlich verschiedene; sie ist jedenfalls abhängig von der relativen Konzentration der Glukoside, sowie von der Wasserlöslichkeit, Diffusionsfähigkeit und Wirksamkeit der entsprechenden Enzyme. Während z. B. bei Rosaceensamen, *Arum maculatum*, *Isopyrum thalictroides*, *Thalictrum aquilegifolium*, *Vicia sativa* die enzymatische Spaltung in kurzer Zeit (bis $^1/_2$ Stunde) erfolgt, benötigt sie bei *Phaseolus lunatus* bereits mehrere, bei *Sambucus nigra* 4 bis 6 Stunden,[1] so daß man die beschickten Glaskammern sicherheitshalber zirka 10 Stunden sich selbst überläßt, bevor ein endgültiger Schluß über den Ausfall der Reaktionen gezogen werden kann. Positive Resultate jedoch lassen sich natürlich schon viel früher gewinnen.

In allen Fällen kann man aber das Freiwerden der Blausäure, insbesondere wenn es sich um Blatt- oder Stengelfragmente handelt, durch Beigabe von Anästhetika (Chloroform, Äther) beschleunigen.

---

[1] *Sambucus nigra* enthält ein besonders träges Emulsin, was Bourquelot und Danjou (Compt. rend., 141. Bd., 1905/2, p. 59 und 598—600) zuerst veranlaßte, den Blättern von *Sambucus* Emulsin überhaupt abzusprechen, während Ravenna von einem wasserunlöslichen Emulsin sprach — Behauptungen, die schon von Guignard (Nouvelles observations etc. Compt. rend., 141. Bd., 1905/2, p. 1193 bis 1201) widerlegt wurden.

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

M. Mirande[1] hat als erster 1909 diese Methode angewendet, indem er Teile von HCN-führenden Pflanzen (Sprosse, Äste oder das ganze Kraut) in eine geschlossene Röhre brachte, die mit Dämpfen von Hg, CS_2, Chloroform, Äther u. a. erfüllt war. Durch die rasche Tötung des Gewebes gelangten die getrennt gelagerten Komponenten, Blausäureglukosid und Ferment, alsbald in Kontakt und es wurde HCN-frei, die mittels eines aufgehängten Pikrinsäuresodapapiers nachgewiesen wurde oder sich durch den bloßen Geruch bemerkbar machte. — Auf diese Weise entdeckte Mirande eine Reihe neuer HCN-führender Pflanzen.

Guignard[2] erzielte mit dieser Methode bei Cruciferen (myronsaures Kalium-Myrosin) ähnliche Resultate. Wie Pougnet[3] zeigte, läßt sich die Abtötung des Gewebes ohne Schädigung des Fermentes auch durch Bestrahlung mit ultraviolettem Lichte (zirka 15 Minuten) bewerkstelligen. Auch in diesem Falle wird aus den Blausäureglukosiden HCN frei.

Die mikrochemische Anwendbarkeit dieser Methode soll an den Verhältnissen bei *Arum maculatum* dargetan werden.

Zerschneidet man ein Blattstückchen von *Arum* so fein als möglich und läßt die Schnitte in der Glaskammer mit Wasser mazerieren, so erscheint erst nach zirka 2 Stunden im hängenden Silbernitrattropfen ein nennenswerter Niederschlag von Silbercyanidkrystallen. Bringt man jedoch ein Blattstückchen von zirka 1 cm^2 Fläche als ganzes in die Glaskammer und befeuchtet es direkt mit einigen Tropfen Chloroform (erst ein Überschuß von Chloroform schädigt Emulsin[4]) und schließt die Kammer durch ein Gläschen mit einem hängenden $AgNO_3$-Tropfen ab, so ist bereits in 5 bis 10 Minuten die Reaktion nahezu beendet und ein reicher AgCN-Niederschlag vorhanden.

Ebenso verlaufen Versuche bei *Isopyrum, Ranunculus arvensis, Melica nutans, Aspidium filix mas, Triglochin palustre.*

Der Zusatz von Chloroform, wie er ja in ähnlicher Weise bereits von Weevers[5] für den mikrochemischen Nachweis von Ammonium vorgeschlagen wurde, bietet demnach bedeutende Vorteile und wurde daher beim HCN-Nachweise ständig angewendet. Überdies wird bei der bis auf 10 Stunden ausgedehnten Fermentation jegliche Bakterienwirkung in irgendeiner Richtung hierdurch völlig ausgeschlossen.

Speziell mit dem Silbernitratreagens im hängenden Tropfen wurden auf diese Weise sämtliche erreichbaren Pflanzen, denen das Vorkommen von HCN zugeschrieben wird,[6] geprüft und nahezu

---

[1] M. Mirande, Influence exercée par certaines vapeurs sur la cyanogenèse végétale. Procédé rapide pour la recherche des plantes à acide cyanhydrique. Compt. rend., Bd. 149 (1909/2), p. 140—142.

[2] L. Guignard, Influence de l'anesthésie et du gel sur le dédoublement de certains glucosides chez les plantes. Comptes rend., 149. Bd. (1909/2), p. 91—93.

[3] M. Pougnet, Actions des rayons ultraviolets sur les plantes à commarine et quelque plantes dont l'odeur provient de glucosides dédoublés. Comptes rend., 151. Bd. (1910), p. 566—569.

[4] Vgl. E. Abderhalden. Biochem. Handlexikon, V. Bd., p. 564—568.

[5] Th. Weevers, Das Vorkommen des Ammoniaks und der Ammonsalze in den Pflanzen. Rec. Trav. bot. Neerl., Bd. 13 (1916), p. 63.

[6] Vgl. die letzte (1919) Liste von Rosenthaler, l. c., p. 295—297, 307—313, 324—329, 341—346.

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

in allen Fällen eindeutig nachgewiesen. Ausnahmen bildeten nur: *Trifolium repens*, *Lepidium sativum*, *Crataegus oxyacantha*, einige Gräser, wobei die Schuld wohl an dem Alterszustande des betreffenden Materials liegen dürfte oder das HCN-Vorkommen da bloß fakultativ ist, wie es H. E. und E. F. Armstrong[1] für das Linamarin von *Lotus corniculatus* bereits feststellten, indem sie Exemplare von allen Teilen Europas untersuchten und »häufig, jedoch keineswegs immer« ein blausäureführendes Glukosid und ein entsprechendes Ferment nachweisen konnten.

Die Gestalt der erhaltenen Silbercyanidkrystalle ist eine je nach Schnelligkeit der HCN-Abspaltung und erreichter Konzentration recht verschiedene; nadelige, rankenförmige oder verfilzte Bildungen treten bei rascher, reichlicher Blausäureabspaltung auf (Rosaceen, Araceen, manche Ranunculaceen), während zumeist stark blau gefärbte Krystalldrusen, Sphärite oder Klumpen entstehen, um so größer, je langsamer die Fermentation vor sich geht. Niemals traten bei der Durchprüfung mehrerer hundert Pflanzen irgendwelche andere Krystalle auf, die durch Methylenblau gefärbt gewesen wären und der Löslichkeit von AgCN entsprachen, häufiger ist nur (z. B. bei Cruciferen) ein durch gasförmige reduzierende Substanzen hervorgerufener Silberspiegel (braune, krystallinische Körnchen oder ein zusammenhängendes Häutchen), der aber die eventuelle Krystallisation des blau gefärbten Silbercyanids nicht beeinträchtigt (z. B. bei *Lepidium Draba*).[2]

Die Empfindlichkeit der angegebenen Reaktionen soll noch durch folgendes Beispiel belegt werden:

Versuchsobjekt: *Thalictrum aquilegifolium* L., junge, unreife Samen (Juli) von zirka 3 *mm* Länge und weniger als 1 *mm* Breite und Tiefe. — Es reagierten

a) mit dem Silbernitratreagens in der Glaskammer (+ Chloroform) sehr rasch — 12 Samen, deutlich — 5 Samen, nach 10 Minuten eindeutig — 1 Samen:

b) mit dem Benzidinreagens sehr deutlich — 5 Samen, deutlich — 1 Samen, noch einwandfrei positiv — $^1/_4$ Same (= zirka Kugel von 1 *mm* Durchmesser!).

---

[1] Henry E. Armstrong, E. Frankland Armstrong und Edward Horton, Studien über Kräuter I.: Lotus corniculatus, eine cyanhältige Pflanze. Proc. Royal. Soc. London. Serie B, 84. Bd. (1911). p. 471—484.

[2] Rhodanwasserstoffsäure, welche die Eindeutigkeit der Reaktion gefährden könnte, kommt im Pflanzenreich nach Czapek (l. c., III. Bd. [1921], p. 190) nur in Cruciferensamen — wohl in Esterbindung — vor. Außerdem gibt W. D. Kooper (Untersuchungen über die schwefelhältigen Verbindungen in Allium cepa. Ztschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- und Genußmittel, 19. Bd. [1910]. p. 569—571) für den Preßsaft von *Allium cepa* einen starken Gehalt an Thiocyanwasserstoff an. Bei der mikrochemischen Untersuchung und bei direktem Zusatz von verdünnter $FeCl_3$ konnte HSCN jedoch nicht nachgewiesen werden. Der von Kooper mit Colasanti's Reaktionen (α-Naphtol, respektive Thymol + konzentrierte H_2SO_4) gefundene Rhodanwasserstoff dürfte daher erst bei der Analyse aus seiner Esterbindung freigemacht worden sein.

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

Nur beschränkte Anwendung kann die viel weniger empfindliche Reaktion mit Merkuronitrat im hängenden Tropfen finden, da die Blausäureverbindungen in der Pflanze meist in sehr geringen Konzentrationen vorhanden sind und bei ihrer Spaltung nur **0·5 %** (*Prunus javanicus*, sehr junge Blätter) — **0·003 %** **HCN** (grüne Rinde von *Sambucus nigra*), bezogen auf das Gewicht der frischen Substanz, entstehen.

Als Untersuchungsmaterial dienten stets intakte Samen und frische Pflanzen, es wurde jedoch auch die Frage geprüft, inwieweit man Herbarmaterial[1] zur Ausführung dieser Reaktionen heranziehen kann, weil dadurch die Durchprüfung seltener oder gerade nicht frisch zur Verfügung stehender Arten ermöglicht wäre. Die Blattfragmente der betreffenden Herbarpflanzen wurden zu diesem Zwecke möglichst fein gepulvert in die kleinen Glaskammern mit fixem Boden (vgl. p. 8) gefüllt und mit Wasser durchfeuchtet. Der Zusatz von Chloroform wurde hierbei — als überflüssig — unterlassen. Wie die nachfolgende Tabelle zeigt, konnte — wider Erwarten — in der Mehrzahl der untersuchten heimischen Blausäurepflanzen HCN nachgewiesen werden, wenn auch überall in geringeren Mengen als beim frischen Material.

Auch hier zeigen sich zwei Gruppen. Diejenigen Pflanzen, die ein faßbares Blausäureglukosid enthalten (für die man daher eine getrennte Lokalisation von Glukosid und Ferment im Gewebe annehmen muß), weisen nicht so wesentlich abgeschwächte Reaktionen bei der Mazeration des getrockneten Materials in bloßem Wasser auf, z. B. Rosaceen, *Pteris*, *Melica*, *Scheuchzeria*, während die Pflanzen mit noch unbekannter oder sogenannter »lockerer« HCN-Bindung (wo man also Glukosid und ein sehr wirksames Ferment in denselben Zellen annehmen könnte), nur sehr schwach oder gar nicht mehr reagierten, z. B. Ranunculaceen, *Arum maculatum*.

Sambucus nigra, der, wie bereits erwähnt, ein sehr träges, schwer wasserlösliches Emulsin hat, reagierte auch in 10 Stunden nur in Spuren; durch Zusatz einiger Schnitte völlig süßer Mandeln (an Stelle eines Emulsinpräparates) konnte

[1] Die einzige Angabe über den HCN-Gehalt trockener Pflanzen fand ich bei M. Mirande (l. c., p. 141), der mit seiner Methode bei trockenen Blättern gar keine HCN feststellen konnte, bei wieder angefeuchteten Teilen nur schlechte Resultate erzielte. E. Couperot (Pertes en nitrates et en acide cyanhydrique, chez les plantes qui en renferment, pendant leur dessiccation, Journ. d. Pharm. et de Chimie, 6e Serie, T. 29 [1909], p. 100—102) erörtert zwar ebenfalls diese Frage, beschränkt jedoch seine Versuche auf drei Hollunderarten (*Sambucus nigra*, *S. laciniata*, *S. racemosa*), die wegen ihres besonders trägen Emulsins (vgl. p. 24) aber keineswegs als typische HCN-Pflanzen angesehen werden können. Langsam nach pharmazeutischer Praxis an der Luft getrocknete Hollunderblätter verlieren hierbei ein Fünftel bis einhalb ihres Gehaltes an HCN und Nitrat, was Couperot einer sekundären Fermentation zuschreibt; die rasch bei 60° im Trockenschrank behandelten Blätter weisen denselben HCN-Gehalt wie frische auf, was bei der schweren Spaltbarkeit des Sambunigrins nicht verwunderlich ist (vgl. die Resultate mit *Sambucus* in umstehender Tabelle!).

Name der Herbarpflanze	Fundort und Zeit	Enthält als HCN-Verbindung	Ausfall der HCN-Reaktion	Vergleichsreaktion mit frischem Material
Pteris aquilina L.	Chodau 1914	Pterisamygdalin	†	††
Isopyrum thalictroides L.	Laibach 1913	?	†	††††
Aquilegia vulgaris L.	Donnersberg 1915	?	†	†††
Ranunculus arvensis L.	Prag 1914	?	0	†††
Thalictrum aquilegifolium L.	Brenner (Tirol) 1914	Gepaart mit Aceton	†	†††
Amelanchier ovalis Med.	Riva 1915	Amygdalin	††	†††
Cydonia japonica Pers.	Prag 1914	Amygdalin	†††	†††
Prunus laurocerasus	Baden 1916	Laurocerasin, Prulaurasin	†††	††††
Prunus padus L.	Prag 1914	Laurocerasin	†	†††
Sambucus nigra L.	Prag 1916	Sambunigrin	(†)	†
Scheuchzeria palustris L.	Mitterbach 1919	?	††	†††
Melica nutans L.	Karlstein 1914	Dhurrin?	††	†††
Melica uniflora Retz.	Wien 1919	Dhurrin?	†	†††
Arum maculatum L.	Wienerwald 1915	?	0	†††

Zeichenerklärung: 0 negativ, (†) HCN in Spuren, †—†††† positiv in verschiedener Stärke.

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

die Spaltung des Sambunigrins beschleunigt werden. In diesem Falle handelt es sich also um die Schädigung des ohnehin schon wenig wirksamen Fermentes, nicht aber um eine beim Trockenprozeß bereits erfolgte Spaltung der Blausäureverbindung.

Um jedoch die Anwendbarkeit und die Vorteile des mikrochemischen Nachweises von HCN aus Pflanzenteilen mittels $AgNO_3$-Methylenblau, respektive Benzidin-Kupferacetat im hängenden Tropfen besser zu veranschaulichen, mögen einige besonders ausgearbeitete Beispiele hiefür angeführt werden.

I. Vorkommen von HCN bei der Gattung *Ribes*.

Nachdem bereits Jorissen[1] 1884 gefunden hatte, daß *Ribes aureum* Pursh. eine blausäureführende Pflanze sei, widmete Guignard[2] später dieser Gattung neuerdings seine Aufmerksamkeit. Aus den Blättern von *Ribes rubrum* L. konnte er während der ganzen Vegetationsperiode HCN gewinnen, und zwar mit fortschreitender Jahreszeit in immer geringeren Mengen: 0·0035 % (vom Lebendgewicht) HCN (Juni) — 0·0015 % HCN (August). Die Rinde der einjährigen Zweige gab nur sehr wenig HCN — es genügte kaum für die Berlinerblaureaktion; in Wurzel und Samen von *R. rubrum* war überhaupt keine HCN nachzuweisen. Das Vorkommen von Cyanwasserstoffsäure bei *Ribes aureum* Pursh. konnte Guignard bestätigen, negativ verliefen seine makrochemischen Blausäurereaktionen hingegen bei Mazeration von *Ribes nigrum*, *R. uva crispa*, *R. sanguineum*, *R. multiflorum*, *R. subvestitum*, *R. prostratum*, *R. Gordonianum* (= *aureum* × *sanguineum*), so daß es den Anschein hatte, als sei das Vorkommen einer cyanogenen Substanz in der Gattung *Ribes* relativ selten.

Im Verlauf eines Jahres prüfte ich nun ständig die im hiesigen botanischen Garten kultivierten 20 *Ribes*-Arten mittels der mikrochemischen Methoden und gelangte zu etwas abweichenden Ergebnissen, die in der folgenden Übersichtstabelle veranschaulicht werden.

Bei der überwiegenden Mehrzahl der untersuchten Arten (14 von 20!) konnte in den jungen, eben ausgetriebenen Blättern und Stengeln HCN nachgewiesen werden, freilich in verschiedener Menge. Unter den blausäureführenden Arten reagierte neben *Ribes rubrum* L. weitaus am stärksten *Ribes alpinum* L.; *Ribes nigrum*, *R. uva crispa*, *R. Gordonianum*, bei denen Guignard keine Blausäure nachweisen konnte, lieferten eindeutig positive Reaktionen.

Bemerkenswert ist jedoch das Verhalten der völlig ausgewachsenen Blätter, die, wie die Tabelle zeigt, bereits im Mai,

[1] A. Jorissen, Bull. de l'acad. roy. des Sciences de Belgique, 1884, 3e serie, t. VIII, p. 257.

[2] L. Guignard, Sur l'existence, dans certains grosseilliers, d'un composé fournissant de l'acide cyanhydrique. Compt. rend., 141. Bd., 1905/2, p. 448—452.

Übersicht über das Vorkommen von HCN bei der Gattung Ribes.

Untergattung [1]	Art	Frühere Untersucher	Untersucht von Guignard 1905	Eigene mikrochemische Untersuchungen am				
				21. III. 1921	10. V. 1921		17. IX. 1921	18. IX. 1921 zum zweiten Male ausgetrieben
					alte Blätter	junge Blätter		
Ribesia Berland	*Ribes rubrum* L.	(†) (1898, A. Hebert)	(†) (0·0035—0·0015%)	†††	††	††	†	
	» *multiflorum* × *petraeum*	—	—	††	0	††	0	—
Coreosma	*Ribes prostratum* L'Her.	—	0	—	—	—	—	—
	» *sanguineum* Pursh.	—	0	0	0	0	—	—
	» *Gordonianum* (*aureum* × *sang.*)	—	0	††	0	††	0	—
	» *aureum* Pursh.	(†) (1884, A. Jorissen)	(†) (weniger als *R. rubr.*)	0	0	0	—	—
	» *lenuiflorum* Lindl.	—	—	††	†	††	—	—
	» *cereum* Dougl.	—	—	0	0	0	—	0
	» *nigrum* L.	(†) (1898, A. Hebert)	0	†	0	††	—	0
	» *floridum* L'Her.	—	—	0	0	0	—	0

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

Grossularia A. Rich.	*Ribes subvestitum* Hook.	—	0	—	—	—	—	—
	» *divaricatum* var. *irriguum* Dougl.	—	—	†	0	†	—	—
	» *oxyacanthoides* L.	—	—	†	0	†	—	††
	» *grossularia* var. *crispa*	—	—	††	0	0	—	—
	» *uva crispa* L.	—	0	†	0	†	—	—
Berisia Spach.	*Ribes diacantha* Pall.	—	—	†	0	0	—	—
	» *alpinum* L.	—	—	†††	0	†	0	†††
	» *glaciale* Wall.	—	—	†	0	0	—	—
Diverse	*Ribes pallidum* Otto u. Dietz	—	—	0	0	0	—	—
	» *pinetorum* Greene	—	—	†	0	0	0	†
	» *chrysococcum* Hort.	—	—	††	†	††	0	—
	» *Spachii* Lam.	—	—	0	0	0	—	—

Zeichenerklärung: (†) positiver makrochemischer Befund. ††† sehr reichlich HCN,
— nicht untersucht, †† deutliche HCN-Reaktionen,
0 negativ, † schwach positiv (deutlicher erst bei leichtem Erwärmen).

[1] Die Anordnung der Untergattungen und Arten sowie die Nomenklatur nach E. d. Janczewski, in Engler-Prantl, Nat. Pflanzenfamilien, Ergänzbd. III (1915), p. 110—111.

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

knapp nach der Blüte, bei den meisten Arten keine mikrochemisch nachweisbaren Mengen von HCN mehr enthalten, während die noch in Ausbildung begriffenen jüngsten Blätter an denselben Sprossen Blausäure in annähernd demselben Maße führen wie die ersten Triebe im März.

Infolge des sehr trockenen, heißen Sommers setzte der Laubfall früh ein; mit Ausnahme von *Ribes rubrum* L., dessen vier letzte Blätter am Strauche, schon völlig vertrocknet, trotzdem noch positiv auf HCN reagierten, konnte bei keiner der Arten mehr Blausäure in den Blättern nachgewiesen werden. Manche der beobachteten Arten jedoch trieben, begünstigt durch das warme Herbstwetter, beim Laubfall zum zweiten Male aus. Diese jungen Blättchen stimmten in ihrem Blausäuregehalt mit denen des Frühjahres überein.

Es hat demnach den Anschein, als ob bei *Ribes* eine Blausäureverbindung nur als intermediäres Produkt beim Aufbau der Blatt- und Stengelorgane auftritt, um dann rasch wieder zu verschwinden. Bloß *Ribes rubrum* L., das HCN besonders reichlich führt, bildet eine Ausnahme von diesem Verhalten. — Damit zeigt *Ribes* einen auffallenden Unterschied gegenüber den Verhältnissen in den beiden folgenden Beispielen, nämlich zu den Blausäureglukosiden der Rosaceen (*Crataegus*) und den nicht näher bekannten HCN-Verbindungen der Araceen.

II. Vorkommen von HCN bei der Gattung *Crataegus*.

Blausäureglukoside finden sich bei den Rosaceen sehr häufig; regelmäßig treten sie auf bei den *Prunoideae*, nicht durchgängig bei den *Pomoideae* und *Spiraeoideae*, gar nicht hingegen bei den *Rosoideae*.

Über die besonders in Nordamerika so artenreiche Gattung *Crataegus* (*Pomoideae*) liegen in dieser Hinsicht noch keine näheren Untersuchungen vor. Nur Wicke[1] und nach ihm E. Lehmann fanden bei *Crataegus oxyacantha* L. HCN nebst Benzaldehyd in den Samen und jungen Sprossen, nicht aber in den Blättern vor.

Im folgenden sei eine Übersicht über 23 von mir nach der mikrochemischen Methode untersuchten *Crataegus*-Arten (zumeist kultiviert im Botanischen Garten der Universität Wien) gegeben. Auch hier wurde die Untersuchung über eine ganze Vegetationsperiode ausgedehnt (vgl. Tabelle p. 34—35).

Hierbei zeigt sich, daß bei *Crataegus* gewisse Arten (*Cr. Douglasii* Ldl., *Cr. pentagyna* W. K., *Cr. Forbesae* Sargent, *Cr. persimilis* [?]) Blausäureverbindungen in den Blättern in hohem Maße und auch nach der Blüte führen, während bei der Mehrzahl der Arten selbst in ganz jungen Trieben und Knospen keine

[1] H. Wicke, Annalen d. Chemie u. Pharm., Bd. 79 (1851), p. 79.

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

Spur von HCN nachweisbar ist. — Irgendeine systematische Verwandtschaft der fünf blausäurehältigen Arten liegt nicht vor. — Wie fast überall, kann auch in diesem Falle eine relative Abnahme des HCN-Gehaltes in den vollentwickelten Blättern (Mai) festgestellt werden; bei *Crataegus Holmesiana* Ashe war dadurch die Empfindlichkeitsgrenze der Reaktion erreicht, so daß die Prüfung im Mai ein negatives Resultat ergab. Bis zum September war bei allen fünf Arten HCN gänzlich verschwunden.

Die Samen erwiesen sich, soweit sie untersucht werden konnten, als blausäurefrei, ein Ergebnis, das dem Befunde Wicke's und den allgemein an Rosaceen gemachten Erfahrungen widerspricht.

III. Vorkommen von HCN bei den *Araceae*.

Die *Araceae* zählen gleichwie die *Rosaceae* und *Gramineae* unter diejenigen Familien, bei welchen am meisten blausäureführende Vertreter bisher bekannt wurden. Um was für eine cyanogene Verbindung es sich hierbei handelt, wurde noch nicht sichergestellt.

Durch die Untersuchungen von Jorissen (1884), Greshoff (1890), v. Romburgh (1897) und insbesondere von Treub[1] (1907) sind im ganzen 31 blausäureführende *Araceae* bekannt,[2] die sich auf die Gattungen *Arum*, *Anthurium*, *Alocasia*, *Colocasia*, *Schizocasia*, *Lasia*, *Cyrtosperma*, *Dracontium* und *Dieffenbachia* verteilen.

Die Anwendung der mikrochemischen Methode gerade bei dieser Familie erschien daher erfolgversprechend, zumal die Aroideen des Mediterrangebietes und die Araceaen der europäischen Gewächshäuser noch kaum eine Untersuchung erfahren haben.

1. *Aroideae*.[3] — Folgende Arten gaben mit ihren Blättern und Stengeln positive Blausäurereaktionen: *Arum Dioscoridis* Sibth et Smith var. *spectabile* Schott (Nr. 3), *Arum orientale* M. Bieb (Nr. 8) in verschiedenen Subspezies, *Arum italicum* Mill (Nr. 11) mit verschiedenen Varietäten, und in Übereinstimmung mit zahlreichen früheren Angaben (Jorissen, Mirande) *Arum maculatum* L. (Nr. 12) in mehreren Varietäten; ebenso *Eminium intortum* O. Ktze. (früher *Helicophyllum* [*Arum*] *Rauwolfii* [Blume] Schott), *Arisarum vulgare* Targ. Tozz. und *Arisarum proboscideum* (L.) Savi, schließlich *Pinellia ternata* (Thunb.) Breitenbach.

Alle angeführten Arten wurden sowohl im ersten Jugendstadium (Jänner, unter Schnee und Laub) als auch knapp vor der

---

[1] M. Treub, Nouvelles recherches etc. II. Ann. d. Jardin Bot. de Buitenzorg, 2e Serie, vol. VI (1907), p. 91.

[2] Vgl. L. Rosenthaler, l. c., Tabelle.

[3] Die Anordnung, Nomenklatur und Numerierung erfolgte wegen der zahlreichen Synonyme, Varietäten etc. nach A. Engler, Das Pflanzenreich (Regni vegetabilis conspectus), Bd. IV, 23 F. Araceae — Aroideae, Leipzig 1920.

Übersicht über das Vorkommen von HCN bei Crataegus.

Ordnung nach C. K. Schneider[1]	Art	Ergebnis der HCN-Reaktionen			Anmerkung
		am 3. IV. 1921 nach dem Austreiben	am 5. V. 1921 im Blütenstadium	17. IX. 1921 Herbstlaub	
Nr. 10	*Crataegus Douglasii* Ldl.	†††	†††	0	Aus Nordamerika stammend
» 15	» *pentagyna* W. et Kitt.	††	†	0	
» 18	» *oxyacantha* L.	0	0	—	Ebenso Varietäten
» 19	» *monogyna* Jacq.	0	—	—	» »
» 20	» *ambigua* Becker	0	—	—	Wahrscheinlich var. *pectinata* Lge.
» 22	» *lanaceifolia* Pers.	0	—	—	
» 23 *a*	» *orientalis* Pall. typ.	0	—	—	
» 23 *b*	» *Tournefortii* Griseb.	0	—	—	= *Cr. orientalis* var. *Tournefortii*
» 25	» *Heldreichii* Boiss.	0	—	—	
» 35	» *flava* Ait.	0	—	—	
» 38	» *stipulosa* Stend.	0	—	—	
» 40	» *punctata* Jacq.	0	—	—	
» 49	» *coccinea* L.	0	—	—	

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

» 49 *A*	» *rotundifolia* Mnch.	0	—	—	
» 50	» *Holmesiana* Ashe	†	0	0	In den erwachsenen Blättern keine HCN mehr
Diverse Arten	*Crataegus caucasica* C. Koch	0	—	—	
	» *Bosciana* M. Roem.	0	—	—	= *Cr. crus galli* L.
	» *grandiflora* K. Koch	0	—	—	
	» *phoenicea* Hort	0	—	—	
Neue, nordamerikanische Arten (1900—1910)	*Crataegus Forbesae* Sargent	†††	††	0	
	» *fusca* Sargent	0	—	—	
	» *Laneyi* Sargent	0	—	—	
	» *persimilis*?	††	†	0	Nur die jeweils jüngsten Blätter reagieren

Zeichenerklärung siehe Übersicht zu I, p. 31.

[1] Camillo Karl Schneider, Illustriertes Handbuch der Laubholzkunde, Jena 1906, I. Bd., p. 766 ff.

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

Blüte (Mitte Mai) untersucht, ohne daß eine wesentliche quantitative Abnahme des Blausäuregehaltes in den ausgewachsenen Blättern festgestellt werden konnte, wie dies für *Arum maculatum* von mancher Seite angegeben wurde.

Bei *Arum maculatum* wurden die einzelnen Teile eingehender geprüft. Die unterirdischen Knollen erwiesen sich als frei von HCN; in reichem Maße führten Cyanwasserstoff alle grünen Teile, einschließlich der jungen Spatha und der Infloreszenzachse bis in die Höhe der männlichen Blüten. Nur der Appendix ergab keine Blausäurereaktion. — Von *Arum Nickelii* (Schott) Engl., einer Varietät von *Arum italicum*, standen auch Früchte und Samen zur Verfügung. Im Juli besaßen die unreifen grünen Früchte und die unreifen Samen einen starken HCN-Gehalt; die Mitte September untersuchten überreifen roten Beeren und die reifen Samen reagierten hingegen völlig negativ.

2. *Araceae* im allgemeinen. — Bei verschiedenen Araceen der hiesigen Gewächshäuser konnte mikrochemisch das reichliche Vorkommen von Cyanwasserstoff zumindest in den jungen grünen Organen bestätigt werden, z. B. bei *Colocasia gigantea* Hook. *Lasia aculeata* Low., *Anthurium pentaphyllum* G. Don. *Anthurium Harrisii* G. Don.

Von den bisher noch nicht untersuchten Arten erwiesen sich folgende Pflanzen in ihren jugendlichen Teilen als blausäureführend: *Anthurium imperiale* Mig., *Anthurium Binotii* Linden, *Anthurium Miguelianum* C. Koch, *Anthurium Scherzerianum* Schott, *Anthurium cuspidatum* Mast., *Alocasia cucullata* Schott, *Dieffenbachia Bausei* Rgl.

Negativ verliefen die Reaktionen bei den Gattungen *Pothos*, *Philodendron*, *Aglaonema*, *Schismatoglottis*, *Tacca*, *Steudnera*, *Amorphophallus*, *Zantedeschia* u. a.

Im ganzen konnten demnach nur bei der Durchprüfung der in den botanischen Instituten der Universität Wien gezogenen Araceen 14 neue blausäureführende Arten gefunden werden. Eine Abhängigkeit des Blausäuregehaltes vom Alter des betreffenden Organs, wie sie bei *Ribes* so deutlich zutage getreten ist, konnte nicht durchgängig, sondern nur bei den *Araceae* mit ausdauernden Blättern (*Anthurium* etc.) festgestellt werden.

IV. Sonstige neue Blausäurepflanzen.

Nach den vorstehenden drei ausgearbeiteten Beispielen, welche zeigen sollen, daß die mikrochemische Methode des HCN-Nachweises auch für den Einblick in die physiologischen Verhältnisse der behandelten Pflanzen von Bedeutung ist, sollen schließlich noch kurz jene Pflanzen angeführt werden, bei denen das Vorkommen von cyanogenen Substanzen gelegentlich der Erprobung der Mikro-Reaktionen ebenfalls neu aufgefunden wurde, welche also zu der Liste der blausäureführenden Pflanzen von L. Rosenthaler (1919) noch hinzuzufügen wären:

Name	HCN nachgewiesen in	Verwandte Arten, bei denen HCN-Reaktionen negativ	In der Literatur als HCN-führend bereits bekannte Verwandte	Ergebnis der mikrochemischen Nachprüfung
Nephrodium filix mas (L.) Rich.	Blätter	—	*Pteris aquilina*, *Cystopteris*-Arten (Greshoff 1909 — Mirande 1912)	0
Ranunculus montanus Willd.	Grüne Teile in ziemlicher Konzentration	*R. alpestris* L. » *aconitifolius* L. » *hybridus* Biria » *scutatus* Schott » *nemorosus* DC. » *lanuginosus* L. » *Steveni* Andrz.	*R. repens* L. » *arvensis* L. (P. Fitschy 1906)	beide stark positiv
Thalictrum minus L. *Thalictrum flexuosum* Bernh.	Blätter (inkonstant, nur bei kleinen Exemplaren) Blätter sehr wenig	*Th. banalicum* Rochel	*Th. aquilegifolium* L. » *angustifolium* (= *Th. lucidum* L.) (L. van Itallie 1905, 1910)	Blätter, Samen stark positiv Blätter positiv (schwach und inkonstant)
Lepidium draba L.	Blätter, besonders stark die jungen (in alten verschwindend), Samen HCN-frei	*L. ruderale* L.	*Lepidium sativum* L. (M. Schulze 1862, Rosenthaler 1919)	Samen, Keimlinge negativ (!)
Hydrangea aspera Buch. Ham.	Blätter, grüne Stengel (stark)	*Hydr. Bredschneideri* Dipp. » *stellata* Sieb. et Zucc. » *petiolaris* Sieb. et Zucc. » *Sargentii* » *japonica* Siebold	*Hydr. hortensis* L. » *involucrata* Sieb. » *Thunbergii* Sieb. » *Lindleyana*	0

Sowie endlich die Rosaceen: *Spirea alpina*, *Amelanchier utahensis* Koch, *Prunus cerasifera* Ehrh. (= *Pr. Myrobalanus*), *Cotoneaster baccilaris* Wall.

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

2. Lokalisierter HCN-Nachweis.

Weitaus schwieriger gestaltet sich der lokalisierte Nachweis von Blausäure im pflanzlichen Gewebe.

Für die sogenannte »locker gebundene« HCN sind bereits zwei diesem Zwecke entsprechende Methoden bekannt: die von Treub[1] eingeführte Berlinerblaureaktion im Verein mit dem Bürstenverfahren und Peche's[2] Nachweis mit Mercuronitrat.[3]

Von der Berlinerblaureaktion sagt Treub[4] selbst: »Es ist, a priori, wahrscheinlich, daß der Niederschlag von Berlinerblau, der sich in den Blättern bei dem angegebenen Verfahren bildet, von dem »quasifreien« HCN herrührt und nicht von der glykosidischen Verbindung (Phaseolunatin). Die folgende Erfahrung zeigt, daß es so ist, ...« Diese Ansicht entspringt aus der Überlegung, daß durch das Eintauchen der Blätter oder Schnitte in die alkoholische Kalilauge (erster Teil der Reaktion) jede weitere fermentative Spaltung eventuell vorhandener HCN-Glukoside unterbrochen und gelähmt werden muß. Aus diesem Grunde wird die Berlinerblaumethode bei allen jenen Objekten versagen, die Glukosid und Ferment räumlich getrennt enthalten,[5] wie z. B. bei trockenen, dünnen Schnitten von der bitteren Mandel, von *Phaseolus lunatus* (Bohnensame) oder bei Blättern von *Sambucus nigra* etc.

Tatsächlich ist die Lokalisation bei der Berlinerblaumethode, wie schon Peche betonte, nur eine bedingte und nur bei den stark HCN-haltigen Tropenpflanzen (*Pangium edule*, *Phaseolus lunatus*, Araceen) stets befriedigend, besitzt jedoch den Vorteil vollkommener Eindeutigkeit. — Schon bei *Prunus laurocerasus*, einer der an Blausäure reichsten Pflanzen der Heimat, sah sich Peche zur Erprobung einer feineren Methode gezwungen; mit dem Mercuronitratreagens erzielte er auch an diesem Objekt sehr günstige Ergebnisse. Wird zur Ergänzung mit demselben Material eine der früher angegebenen qualitativen Mikroreaktionen durchgeführt, so ist auch die Herkunft des reduzierten, metallischen Quecksilbers eindeutig sichergestellt. — Dort, wo keine »lockere« HCN-Bindung vorliegt, z. B. bei *Arum maculatum*, versagt aber auch diese Methode, was bereits Peche anscheinend erkannte.

Die für den qualitativen Blausäurenachweis so empfindlichen Reaktionen mit Silbernitrat und Benzidin-Kupferacetat kommen

---

[1] M. Treub, l. c. (1895), p. 1—12.

[2] K. Peche, l. c., p. 4—5 (des Separat.).

[3] Betreffs der Art der Durchführung beider Reaktionen vgl. neben den Originalarbeiten auch: H. Molisch, Mikrochemie der Pflanze, 2. Aufl. (1921), p. 191 bis 193; O. Tunmann, Pflanzenmikrochemie, 1913, p. 358—359.

[4] M. Treub, l. c., 1905 (*Phaseolus lunatus*), p. 94.

[5] Die »lockere« HCN-Bindung kann man hingegen, wie bereits angedeutet, als eine topographische Koexistenz von Blausäureglukosid und wirksamem Enzym auffassen (vgl. p. 6).

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

für die Lokalisationsermittlung im Pflanzenschnitt nicht in Betracht. 1% Silbernitrat schädigt zwar, wie ich mich durch Versuche überzeugte, den fermentativen Prozeß gar nicht, doch das bei direktem Kontakt gefällte Silbercyanid ist amorph, käsig weiß, ähnlich wie Silberchlorid, und kann (vgl. p. 8) erst durch Umkrystallisieren mit NH_3 als Silbercyanid identifiziert werden, wodurch jede Lokalisation verloren geht. Das Benzidinreagens ist gegen zahlreiche in den Schnitten vorkommende Stoffe empfindlich (z. B. werden die sauerstoffübertragenden Kuprisalzspuren von Gerbstoffen abgefangen — *Prunus laurocerasus*), so daß es bei direktem Kontakt mit diesen in der Regel versagt (vgl. p. 50).

Für den lokalisierten Nachweis der aus den Glukosiden bei langsamer Fermentation abgespaltenen HCN ist daher keine der vier erwähnten Proben als »abfangendes« Reagens geeignet.

Man kann also zusammenfassend feststellen, daß der lokalisierte Nachweis der aus pflanzlichem Gewebe freiwerdenden Blausäure mit den bisher bekannten Methoden bei der großen Mehrzahl der cyanogenen Pflanzen nicht gelingt, in besonders günstigen Fällen jedoch (bei der sogenannten »lockeren« Bindung) und bei relativ konzentriertem Vorkommen Treub's Berlinerblaureaktion und Peche's Mercuronitrat brauchbare Resultate liefern.

Die rein qualitativen HCN-Reaktionen mit Silbernitrat-Methylenblau und Benzidin-Kupferacetat im hängenden Tropfen sind jedoch bei sämtlichen cyanogenen Pflanzen anwendbar und speziell erstere stets eindeutig.

C. Versuch des direkten mikrochemischen Nachweises eines Blausäureglukosids.

Die Unmöglichkeit eines lokalisierten Nachweises der aus den Blausäureglukosiden abgespaltenen HCN, die im vorhergegangenen Abschnitte aufgezeigt wurde, legte den Gedanken nahe, vielleicht die Glukoside selbst, noch ungespalten, analytisch zu fassen und damit dem rein qualitativen Blausäurenachweis eine wertvolle Ergänzung zu geben.

Am längsten bekannt und am eingehendsten studiert ist das Amygdalin (erste Darstellung 1830 von Robiquet-Boutron Charland) und an diesem, bei den Rosaceen (*Prunoideae-Pomoideae*) so verbreiteten Glukosid habe ich alle Möglichkeiten für den direkten mikrochemischen Nachweis dieser Substanz erprobt.

Amygdalin ist leicht löslich in Wasser und Alkohol, unlöslich in Äther. Schon allein diese gute Löslichkeit läßt einen lokalisierten Nachweis fraglich erscheinen. Durch heiße verdünnte Säuren wird Amygdalin hydrolysiert, doch sind alle entstehenden Produkte selbst wieder leicht löslich. Mit konzentrierter H_2SO_4 gibt es, wie einige andere Glukoside (z. B. Salicin, Coniferin) eine tiefrote Färbung; mikrochemisch ist diese Eigenschaft jedenfalls nicht verwertbar. Wohl wird ein

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

Schnitt von einer bitteren Mandel in konzentrierter H_2SO_4 in kurzem tiefviolettrot, doch zeigt ein unter gleiche Bedingungen gebrachter Schnitt einer süßen Mandel, die nachweislich höchstens Spuren eines Blausäureglukosides enthält, dieselbe Farbenreaktion, wenn auch in weit geringerem Grade; offensichtlich tritt hier die bekannte Raspail'sche Reaktion ein.

Durch Kochen mit Kalilauge oder Barytwasser wird Amygdalin in Amygdalinsäure $C_{20}H_{28}O_{13}$ und NH_3 gespalten. Diesem Umstande schreibt es auch Rosenthaler[1] zu, daß Amygdalin mit Nessler's Reagens einen gelb- bis braunroten Niederschlag liefert, der beim Erhitzen seine Farbe kaum ändert (im Gegensatz zum Salicin); das durch die freie Lauge des Reagens abgespaltene NH_3 bildet das hitzebeständige, unlösliche NHg_2J.

In der Tat erhält man einen teilweise lokalisierten braunen Niederschlag, wenn man Schnitte von bitteren Mandeln, Apfel- oder Quittenkernen in Nessler's Reagens auf dem Objektträger vorsichtig kurze Zeit erwärmt. Wie viel jedoch hierbei durch Ammoniumverbindungen oder organische Substanzen mit einer NH_2-Gruppe verursacht wurde, bleibt unentschieden.

Doch schon bei *Prunus laurocerasus* L. (Schnitte aus Blatt und Stengel) versagt die Reaktion vollends, indem sich die von Peche[2] näher studierten zahlreichen Gerbstoffzellen sofort intensiv gelb bis orange färben, bei stärkerem Erwärmen hingegen das Nessler'sche Reagens zu einem tiefschwarzen Niederschlag reduzieren. — Es sprechen also dieselben Einwände, die gegen die Verwertbarkeit von Nessler's Reagens zum Ammoniumnachweis im Gewebe geäußert wurden,[3] in noch gesteigertem Maße gegen seine Verwendung zum Nachweis von Amygdalin und anderer HCN-Glukoside, zumal da auch die meisten Saponine, wie J. Vamvakas[4] und Rosenthaler[5] zeigten, mit diesem Reagens starke Fällungen geben und nach der Zusammenstellung E. Schaer's[6] bei 22 Pflanzenfamilien Saponine zugleich mit Blausäureglukosiden vorkommen.

Mit Kaliumpermanganatlösung sollen aus Amygdalin cyansaures und benzoesaures Kalium entstehen. Mikrochemisch gelang es mir nicht, aus Schnitten, die in Kaliumpermanganat eintrocknen gelassen wurden, Benzoesäure zu sublimieren. Als lokale Reaktion käme dieser Weg ohnehin nicht in Betracht.

Die übrigen Blausäureglukoside stimmen in ihrem chemischen Verhalten im wesentlichen mit Amygdalin überein, so daß auch bei ihnen keine besseren Resultate zu erzielen wären.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, daß ein direkter mikrochemischer Nachweis dieser Körper mit Hilfe ihrer bis jetzt bekannten Eigenschaften nicht gelingt, weder qualitativ in eindeutiger Weise, noch auch lokalisiert. — Es zeigt sich in diesem negativen Ergebnisse eine gewisse Analogie mit den Verhältnissen bei dem Sinigrin der Cruciferen, das Peche[7] an einzelnen

---

[1] L. Rosenthaler, Das Verhalten von Nessler's Reagens gegen einige Glukoside (speziell Saponine) und Kohlehydrate. Pharm. Zentr. H. 47, p. 581; Ref. Chem. Zentralbl., 1906, II, p. 718.

[2] K. Peche, Mikrochemischer Nachweis der Cyanwasserstoffsäure in Prunus Laurocerasus L. Sitzber. d. Akad. d. Wissensch. in Wien, 1912, Bd. CXXI, Abt. I.

[3] Vgl. H. Molisch, Mikrochemie der Pflanze, 1913, p. 61.

[4] Jean Vamvakas, Nessler's Reagens als Mittel des Nachweises von Saponin. Ref. Chem. Zentralbl., 1906, II, p. 167—168.

[5] L. Rosenthaler, l. c., p. 718.

[6] Ed. Schaer, Schweiz. Wchschft. f. Chemie u. Pharmacie, 1910, XLVIII, p. 645, zitiert nach Tunmann.

[7] K. Peche, Mikrochemischer Nachweis des Myrosins. Ber. d. deutsch. Bot. Gesellsch., 1913, Bd. 31, Heft 8, p. 458—462.

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

Objekten nachzuweisen versuchte, jedoch zu keinen befriedigenden, eindeutigen Reaktionen gelangte.

D. Mikrochemischer Nachweis des Emulsins in pflanzlichen und tierischen Objekten.

Wenn man den Begriff »Emulsin« in der Weise faßt, daß man alle ungeformten Enzyme in Pflanze und Tier, die imstande sind, Amygdalin in HCN, Benzaldehyd und Zucker zu spalten, als »Emulsin im Sinne eines Gruppenbegriffes« (Molisch[1]) bezeichnet, so genießt dieses Ferment bei allen Lebewesen, von den Bakterien, Pilzen und Flechten angefangen, bis selbst zum Menschen herauf eine weite Verbreitung.[2]

Wie Molisch[1] betont, sind spezifische, mikrochemische Reaktionen, die eindeutig Emulsin anzeigen, bisher nicht bekannt. Es lag daher der Gedanke nahe, die im Abschnitt *B* geschilderten empfindlichen, rein qualitativen Mikroreaktionen auf HCN mittels $AgNO_3$, respektive Benzidin-Kupferacetat auch für den qualitativen Nachweis von Emulsin in biologischen Objekten zu verwerten.

1. Qualitativer mikrochemischer Nachweis von Emulsin.

Bei makro-, respektive biochemischen Untersuchungen wurde Emulsin in der Weise nachgewiesen, daß ein feines Gereibsel des Objektes (5 bis 50 *g*!) mit einer 1 bis 5 %-Lösung von Amygdalin zusammengebracht und unter Ausschluß von Bakterienwirkung bei erhöhter Temperatur (25° bis 38° C.) durch 24 bis 48 Stunden der Fermentation überlassen wurde. Der eventuelle Eintritt der Amygdalinspaltung wurde entweder bloß durch Auftreten des Bittermandelölgeruches (R. Kobert,[3] M. Gonnermann[4]) eventuell in Verbindung mit dem HCN-Nachweis mittels Schönbein's Guajakonsäure-Kupfersulfatpapier festgestellt oder es wurde in exakterer Weise die entstandene Blausäure abdestilliert und im Destillat nachgewiesen (L. Guignard,[5] Bertrand und Rivkind,[6] L. Rosenthaler,[7] S. Higuchi[8]),

---

[1] H. Molisch, l. c., 1921, p. 322—323.

[2] Bezüglich der Verbreitung vgl. E. Abderhalden, Biochemisches Handlexikon, V. Bd., p. 564—568, sowie die dort zitierte Literatur.

[3] R. Kobert, Über einige Enzyme wirbelloser Tiere. Pflüger's Archiv f. d. ges. Phys., 99. Bd. (1903), p. 116—186.

[4] M. Gonnermann, Über das Spaltungsvermögen von Leberhistozym und einiger Enzyme auf einige Glykoside und Alkaloide. Pflüger's Archiv f. d. ges. Phys., 113. Bd. (1906), p. 168—197.

[5] L. Guignard, Quelques faits relatifs à l'histoire de l'émulsine; éxistence générale de ce ferment chez les Orchidées. Compt. rend., Bd. 141 (1905/2), p. 637 bis 640.

[6] G. Bertrand et L. Rivkind, Sur la répartition de la vicianine et de sa diastase dans les graines de Légumineuses. Compt. rend., Bd. 143 (1906/2), p. 970 bis 972.

[7] L. Rosenthaler, Über die Verbreitung emulsinartiger Enzyme. Arch. d. Pharm., Bd. 251 (1913), p. 56—84.

[8] S. Higuchi, Über die pharmakologischen Wirkungen der Plazenta. Biochem. Ztschft., 17. Bd. (1909), p. 21—67.

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

schließlich griff man wie Gonnermann[1] und Higuchi[2] bei tierischen Geweben zum Zuckernachweis in der Mazerationsflüssigkeit oder man bestimmte nach Bourquelot's[3] biologischer Methode die Amygdalinspaltung nach dem Rückgang des Drehungsvermögens in der Probeflüssigkeit.

Beim mikrochemischen Emulsinnachweis kommt jedoch im allgemeinen nur die Feststellung des einen Spaltproduktes des Amygdalins — der Blausäure HCN — in Betracht, da reduzierende Zucker in Pflanzenteilen meist schon von vornherein enthalten sind und für Benzaldehyd bisher kein eindeutiges, empfindliches Mikroreagens bekannt wurde, die Geruchsprobe aber subjektiv und wenig empfindlich ist und durch andere flüchtige Substanzen völlig unmöglich gemacht werden kann.

Daß die HCN-Abspaltung aus Amygdalin immer als Enzymwirkung des zugesetzten Gereibsels aufzufassen ist, erörtert bereits eingehender Rosenthaler[4] in bejahendem Sinne; bei Vermeidung höherer Temperaturen und bei strengem Ausschluß von Bakterienwirkung ist eine andere als rein fermentative HCN-Abspaltung aus dem stabilen Amygdalin in neutral reagierendem Medium wohl ausgeschlossen.

Zum Nachweis der entstandenen HCN läßt sich 1% Silbernitrat-Methylenblau, respektive Benzidin-Kupferacetat im hängenden Tropfen verwenden.

a) Durchführung der mikrochemischen Probe auf Emulsin. — Eine sehr geringe Menge der Substanz (Samen, Frucht, frische Stengel und Blätter oder Drogen, respektive Herbarmaterial; ganze Tiere oder einzelne tierische Organteile) wird — eventuell unter Zuhilfenahme von Quarzsand — zu einem feinen Pulver, beziehungsweise Brei zerrieben.[5] Die so vorbereitete Substanz gelangt in eine Glaskammer mit fixem Boden (14 *mm* Durchmesser, 5 *mm* Höhe) und wird mit einer 5%-Amygdalinlösung[6] — höchstens mit $^1/_2$ cm^3 — angerührt, die überdies ein Antisepticum enthält, auf dessen Wahl im nächsten Punkt (*b*) näher eingegangen werden soll.

Die Glaskammer wird hierauf durch einen Objektträger abgeschlossen, der nebeneinander je einen hängenden Tropfen von 1%-Silbernitrat-Methylenblau und von Benzidin-Kupferacetatlösung

---

[1] M. Gonnermann, l. c.

[2] S. Higuchi, l. c.

[3] Em. Bourquelot, Über den Nachweis der Glykoside in den Pflanzen mit Hilfe des Emulsins. Arch. d. Pharm., 245. Bd. (1907), p. 172—180.

[4] L. Rosenthaler, l. c. (1913), p. 59.

[5] Auch ein oder mehrere Schnitte können verwendet werden, nur wird dadurch die Reaktionszeit etwas verzögert.

[6] Amygdalin wurde als Originalpräparat von C. Kahlbaum verwendet; bei lang andauernder Selbstmazeration erwies es sich als völlig frei von eventuellen Ferment(Emulsin)verunreinigungen.

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

trägt. Auf die Darbietung einer erhöhten oder optimalen Temperatur (25 bis 40°) während der nun erfolgenden Fermentation, wie dies bisher üblich, wurde verzichtet, um besondere Vorkehrungen gegen das Eintrocknen der hängenden Tropfen in der Glaskammer zu erübrigen und das vorzeitige Abdampfen des zugesetzten Antisepticums zu verhindern. Ich führte vielmehr sämtliche derartigen Proben bei einer Zimmertemperatur von 8° bis 16° aus. Trotzdem zeigte sich im allgemeinen — z. B. bei *Secale cornutum*, *Sinapis alba*, *Coriandrum*, *Anthyllis vulneraria*, *Aspergillus niger*, *Melolontha vulgaris* (Maikäfer) — schon nach $1^1/_2$ bis 2 Stunden in beiden Reagenstropfen deutliche Reaktion auf HCN, regelmäßig stärker in dem von Benzidin (große blaue Nadeln und Aggregate), oft erst in Spuren im Silbernitrat (blau gefärbte Knollen und Drusen von Ag CN). In längstens 8 bis 12 Stunden lassen sich auch nicht sehr wirksame Emulsine (*Ricinus communis*, *Gleditschia triacanthos* [Samen]; Rinderleber) durch das Entstehen einer schwachen HCN-Atmosphäre in der Mazerationskammer mittels beider Reagentien nachweisen.[1] Länger als 24 Stunden wurde der Mazerationsprozeß in keinem Falle fortgesetzt, da bei Erschöpfung des Antisepticums die Gefahr einer Bakterienwirkung zu befürchten war.

b) Wahl des Antiseptikums. — Da bis jetzt ungefähr sieben Bakterienarten bekannt geworden sind, die Amygdalin unter Bildung von Blausäure zu spalten vermögen, kann der oben beschriebenen Reaktionsanstellung eine wirkliche Eindeutigkeit nur zugeschrieben werden, wenn die Entwicklung von Fäulnis auf dem organischen Gereibsel durch Antiseptica hintangehalten wird. Nicht alle Antiseptica sind hierzu verwendbar. Zugesetztes Sublimat oder Silbernitrat würden den gebildeten Cyanwasserstoff abfangen, Formol hemmt bereits in Spuren jede Emulsinwirkung gänzlich. Von Kobert[2] und seinen Schülern[3] wurden hauptsächlich drei Antiseptica in wechselnder Zusammensetzung und Konzentration beim Fermentnachweis verwendet: Toluolwasser (Toluol zu 3% wasserlöslich; eingeführt von E. Fischer), Chloroformwasser und Natriumfluorid (bei 15° C. zu 4% wasserlöslich; eingeführt von Tappeiner). Letzteres schien besonders geeignet, wenn auch schon Kobert[2] und in eingehenderer Weise Higuchi[3] darauf hinwiesen, daß NaF bei gewissen Objekten (menschliche Plazenta) die Wirkung der nicht organisierten Fermente vernichtet oder wenigstens nicht aufkommen läßt, schon in Konzentrationen, die nicht mehr als Fäulnisschutz angesehen werden können.

---

[1] Bezüglich Ag CN vgl. p. 8—14; bezüglich des Benzidinoxydationsproduktes p. 20—22.

[2] R. Kobert, l. c. (1903), p. 117—118.

[3] Werner Fischer, Über einige Enzyme wirbelloser Tiere. Therap. Monatshefte, 16. Jahrg. (1902), p. 619—621. — S. Higuchi, l. c. (1909), p. 22—24.

Einer der diesbezüglichen Versuche möge in folgender Tabelle dargestellt werden:

30. X. 1921. Zimmertemperatur: 12° C. Mazerationsflüssigkeit: 5 % Amygdalinlösung in dem angegebenen Antisepticum.

Nr.	Antisepticum	Objekt in der Glaskammer (in der gleichen Menge)	Angesetzt um	1. Kontrolle um $11^h\,45^m$ vorm.	2. Kontrolle von $2^h\,30^m$ bis $2^h\,40^m$ nachm.	3. Kontrolle um $3^h\,25^m$ nachm. [1]	4. Kontrolle um $6^h\,10^m$ nachm.
1	Übersättigtes Chloroformwasser	*Anthyllis vulneraria* L. (Samen)	$10^h\,05^m$ vorm.	Benzidin: †† $AgNO_3$: ††	beide †††	beide †††	beide ††††
2	Übersättigtes Toluolwasser		$10^h\,25^m$ vorm.	Benzidin: †† $AgNO_3$: †	beide †††	beide ††	beide ††††
3	Keines		$10^h\,35^m$ vorm.	Benzidin: †† $AgNO_3$: Spur	beide †††	beide ††	beide ††††
4	$1\frac{1}{2}$ % Natriumfluorid		$10^h\,50^m$ vorm.	Benzidin: † $AgNO_3$: 0	beide ††† ! stärker als Nr. 1—3	beide †††	beide ††††

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

Nr.	Antisepticum	Objekt in der Glaskammer (in der gleichen Menge)	Angesetzt um	1. Kontrolle um $11^h\ 55^m$ vorm.	2. Kontrolle um $3^h\ 05^m$ nachm.	3. Kontrolle um $6^h\ 50^m$ nachm.	
5	Übersättigtes Chloroformwasser	*Melolontha vulgaris* (Maikäfer). Trockenpulver ohne Chitingerüst	$10^h\ 05^m$ vorm.	Benzidin: Spur $AgNO_3$: 0	Benzidin: ††† $AgNO_3$: ††	beide ††	
6	Übersättigtes Toluolwasser		$10^h\ 25^m$ vorm.	—	Benzidin: ††† $AgNO_3$: †	beide †††	
7	Keines		$10^h\ 35^m$ vorm.	—	Benzidin: †† $AgNO_3$: †	beide †††	
8	$1^1/_2\ \%$ Natriumfluorid		$10^h\ 50^m$ vorm.	—	Benzidin: ††† $AgNO_3$: †† (mehr wie Nr. 5—7!)	beide †††! mehr wie Nr. 6 und 7	

[1] Bei Versuch Nr. 1 bis 4 wurden nach der 2. Kontrolle ($2^h\ 40^m$ nachm.) frische hängende Tropfen exponiert, die dann zur 3. und 4. Kontrolle dienten.

Zeichenerklärung: 0 negative HCN-Reaktion, † bis †††† positive HCN-Reaktion in steigender Intensität.
— nicht geprüft.

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

Für meine Untersuchungen verwendete ich übersättigtes Toluolwasser-Amygdalin (5% Amygdalinlösung mit überschüssigem Toluol knapp vor Eintragen in die Glaskammer gut geschüttelt), übersättigtes Chloroformwasser-Amygdalin (5% Amygdalinlösung mit Chloroform im Überschuß knapp vor Gebrauch geschüttelt), so daß auch ungelöstes, bloß emulgiertes Chloroform (Toluol) in die Glaskammer gelangte und gesättigtes (4%) Natriumfluorid-Amygdalin. Soweit untersucht, konnte bei keinem der genannten drei Antiseptica eine enzymhemmende Wirkung beobachtet werden, ja bei Natriumfluorid zeigte sich an tierischen Objekten (Maikäfer, Rinderleber) sogar eine gewisse Förderung, die wohl der Salzwirkung zuzuschreiben sein wird (Parallelversuche mit Chloroform und Toluol wurden ohne physiologische Kochsalzlösung geprüft!).

c) Vorteile der mikrochemischen Methode. — Empfindlichkeit. — Schon aus der eben angeführten Tabelle lassen sich die Möglichkeiten erkennen, die die beschriebene Methode bietet. Die Zeitspanne, die das Ferment (Emulsin) unter den gegebenen Bedingungen braucht, um eben in seiner Wirkung einzusetzen, läßt sich genau feststellen (Aktivierungszeit). Ihr Ende tritt dann ein, wenn das empfindlichere Benzidinreagens bereits positiv auf HCN reagiert, während im Silbernitrattropfen noch kein AgCN ausgefallen ist (vgl. in der Tabelle Nr. 4 und 5 bei der 1. Kontrolle!); die Zeit, welche vom Entstehen von HCN in der Mazerationsflüssigkeit bis zur Reaktion derselben im hängenden Tropfen verstreicht, ist hierbei als ein in allen Fällen konstanter Fehler in Rechnung zu stellen. Ein Vergleich der Wirksamkeit von Emulsinen verschiedener Herkunft ist somit ermöglicht. — Die Fällung von Silbercyanid im hängenden $AgNO_3$-Tropfen erlaubt jedoch auch eine quantitative Abschätzung der entstandenen Blausäuremengen; die Intensität der fermentativen Amygdalinspaltung zweier emulsinhaltiger Objekte läßt sich — unter sonst gleichen Bedingungen — daher ebenfalls in relativem Maßstabe vergleichen. Da infolge der Empfindlichkeit der HCN-Reagentien hierzu nur äußerst geringe Substanzmengen erforderlich sind, kann diese Mikroreaktion als orientierende Vorprobe bei Untersuchung der Enzymwirksamkeit und Spaltungsintensität irgendeines Emulsins dienen. Emulsin konnte z. B. in einem dünnen Querschnitt von *Secale cornutum* und in einem zerquetschten Samenkörnchen von *Anthyllis vulneraria* (zirka 2 *mm* im Kubus) auf diese Weise innerhalb weniger Stunden (zwei bis vier) nachgewiesen werden.

d) Resultate bei Anwendung der Reaktion auf Pflanzenobjekte. — Bertrand und Rivkind[1] haben anläßlich einer Untersuchung über das Vorkommen des Vicianins bei den Leguminosen auch der Verbreitung des Emulsins in

[1] R. Bertrand und L. Rivkind, l. c. (1906), p. 970.

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

diesen Samen durch systematische Untersuchungen ihr Augenmerk geschenkt. Sie prüften zirka 40 Gattungen mit 60 Arten und fast alle Samen gaben ein positives Resultat. Nur folgende Arten lieferten keine Reaktion, wurden daher als emulsinfrei (»en quantité appréciable«) bezeichnet: *Cassia fistula* L., *Ceratonia siliqua* L., *Galega officinalis* L., *Lathyrus silvestris* L. var. *améliorée*, *Gleditschia triacanthos* L., *Lupinus albus* L., *Sophora japonica*, *Vicia narbonensis* L.

Es schien nun von Interesse, was für Resultate in diesem Falle mit der angegebenen Mikroreaktion zu erzielen wären. Es ergab sich, daß bei sämtlichen Leguminosensamen ohne Ausnahme Emulsin nachgewiesen werden kann. Während bei *Colutea arborescens* L., *Lens esculenta* Mnch., *Vicia sativa* L. (sofern nicht selbst HCN-, respektive vicianinführend), *Lotus corniculatus* L., *Lathyrus sativus* L. und *L. pratensis* L., *Anthyllis vulneraria* L., *Lupinus* sp., *Astragalus glycyphyllos* L. z. B. die Abspaltung von Blausäure aus Amygdalin rasch und reichlich erfolgt, setzt die Emulsinwirkung bei *Cassia*-Arten (*Cassia orientalis* L., *C. Absus* L.), bei *Ceratonia siliqua* L., *Galega officinalis* L., *Lathyrus silvestris* L. var. *platyphyllos*, *L. niger*, *Gleditschia triacanthos* zwar im selben Zeitpunkt ein, hält sich jedoch in engen Grenzen, so daß man beispielsweise bei *Gleditschia*, *Galega* oder *Lathyrus niger* während einer 20stündigen Mazeration mit einem Paar hängender Tropfen auskommt, während *Colutea*-, *Lotus*- oder *Anthyllis*-Samen ein erschöpftes Sublimat nach dem anderen liefern können. — Mit der empfindlichen und durch ihre Anordnung jeden HCN-Verlust ausschließenden mikrochemischen Reaktion zeigt sich demnach bei den Samen der Leguminosen kein qualitativer Unterschied im Emulsinvorkommen,[1] sondern bloß eine Differenz in der Aktivierung und Wirksamkeit dieses Fermentes bei den einzelnen Gattungen und Arten.

Überhaupt ist das Vorkommen von Emulsin in Samen und Früchten etwas beinahe zu Erwartendes. Daß *Ricinus*-, *Sinapis*-, *Brassica*-, *Cannabis*- und *Cucurbita*-Samen Amygdalin spalten, ist schon lange bekannt. Doch auch in Samen von *Vitis vinifera* (schwach), *Galium silvaticum*, *Plantago media* (besonders wirksam!), *Aquilegia vulgaris* (im Gegensatz zu einer Angabe Rosenthaler's[2]), *Citrus medicus* (nur schwach), *Lepidium draba*, *Lepidium ruderale* (schwach) und bei Früchten von *Capsella bursa pastoris* konnte mikrochemisch ein emulsinartiges Ferment festgestellt werden.

Rosenthaler machte schließlich auf das Vorhandensein von Emulsin in Umbelliferenfrüchten aufmerksam: von *Foeniculum vulgare*, *Carum carvi*, *Anethum graveolens*, *Conium maculatum*, *Oenanthe phillandrium*, *Petroselinum sativum* konnte er wirksame Enzympräparate gewinnen, bei *Pimpinella anisum* und *Coriandrum sativum* waren nur die gepulverten Früchte selbst aktiv.

---

[1] Bertrand und Rivkind setzten nicht Amygdalin, sondern Vicianin (aus *Vicia angustifolia* und *V. macrocarpa*; vgl. p. 2) zu; dieser Umstand kann aber nicht als wesentlich beeinflussend angesehen werden.

[2] L. Rosenthaler, Über die Verbreitung emulsinartiger Enzyme. Arch. d. Pharm., Bd. 251 (1913), p. 56—84.

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

Bei mikrochemischer Nachprüfung reagierten alle diese Drogen rasch und stark positiv auf Emulsin; doch auch andere, wahllos gesammelte Umbelliferenfrüchte, z. B. *Sanicula europea* (!), *Pimpinella magna*, *Daucus carota*, *Bupleurum falcatum*, *Anthriscus silvestris* (!), *Silaus Besseri*, *Sium latifolium* (!!) zeigten Amygdalinspaltung in stärkerem oder geringerem Maße.

Frische, grüne Pflanzenorgane, gut zerrieben, liefern ebenfalls die Reaktion, wie z. B. *Achillea millefolium* (Blütendroge von Rosenthaler schon erwähnt), *Tropaeolum majus* (in 6 Stunden), *Mimosa pudica* (in $4^1/_2$ Stunden), *Aucuba japonica*, doch war die Spaltung, wie bei gewissen früher erwähnten Leguminosensamen, zwar relativ rasch eingetreten, aber quantitativ gering und selbst bei längerer (24- bis 36stündiger) Fermentation an Intensität und Spaltungsgeschwindigkeit nicht wesentlich zunehmend.

Überblickt man diese Resultate zusammen mit den von Rosenthaler[1] an den verschiedensten Drogen gemachten Erfahrungen, im Verein mit den vielen verstreuten Angaben über mehr zufällig festgestelltes Emulsinvorkommen (vgl. E. Abderhalden, Biochem. Handlexikon, V. Bd., p. 564—568), in Zusammenhalt mit der Tatsache, daß bei keiner der bis jetzt bekannten 400 blausäurehältigen Pflanzen, die sich auf das ganze Pflanzenreich verteilen, Emulsin gefehlt hätte (Grenzfall *Sambucus nigra*), ja häufig in solcher Wirksamkeit und allgemeiner Verteilung in den betreffenden Gewächsen vorhanden ist, daß eine Analyse der intra vitam bestehenden HCN-Verbindung erschwert oder verhindert wird (»lockere« HCN-Bindung), so scheint es keine Übertreibung, wenn man sagt, daß »Emulsin« im Pflanzenreiche eine derart weite Verbreitung besitzt, daß in Hinkunft die Feststellung des eventuellen gänzlichen Fehlens von Emulsin bei einer Pflanzenart von wesentlich größerem Interesse sein wird als weitere positive Angaben.

Jedenfalls ist die von Guignard[2] geäußerte Ansicht, daß der Emulsingehalt der Pflanzen in einem gewissen Zusammenhang mit der heterotrophen Lebensweise steht (Pilze, Flechten, *Lathraea squamaria*, *Monotropa Hypopitys*, *Orobanche Galii* und *O. epithymum*, Orchideenwurzeln [*Mykorrhiza*-Pilz]), nach den heutigen Erfahrungen nicht mehr aufrechtzuerhalten. Eher läßt sich an einen Zusammenhang zwischen Emulsin und der Ausrüstung der Pflanzen an Diastase- und Maltasefermenten denken, wofür besonders die Befunde an Samen und Früchten (Leguminosen, Umbelliferen u. a.), sowie die allgemeine Verbreitung sprechen.

Sicherlich wird aber der mikrochemische Emulsinnachweis bei Ermittlung von nur schwach wirksamem Emulsin oder bei

---

[1] L. Rosenthaler, l. c.

[2] L. Guignard, Quelques faits relatifs à l'histoire de l'émulsine etc. Compt. rend., Bd. 141 (1905 2), p. 637—640.

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

Feststellung des gänzlichen Fehlens dieses Fermentes in beliebigen Pflanzenteilen gut brauchbar sein, wenn auf völlige Antisepsis entsprechend geachtet wird.

c) Anwendung der Reaktion bei tierischen Objekten. — Durch Kobert und seine Schüler sowie durch eine Reihe französischer Forscher wurde die weite Verbreitung von amygdalinspaltenden Fermenten bei niederen und höheren Tieren bekannt. — Mit gepulverter Maikäfersubstanz (ohne Chitinpanzer) von Maikäfern, die ein Jahr lang lufttrocken aufbewahrt waren[1] und mit zu Brei zerriebener, frischer Rinderleber[2] gelang der mikrochemische Nachweis von Emulsin auch ohne Anwendung von 0·9% Kochsalzlösung und erhöhter Temperatur in eindeutiger und rascher Weise (Maikäfer in 2 Stunden, Rinderleber in 12 bis 19 Stunden). Alle drei angewendeten Antiseptica erwiesen sich hierbei als brauchbar (vgl. Tabelle, p. 45, Nr. 5 bis 8).

Menschliche Plazenta läßt sich jedoch nicht so einfach behandeln, worauf schon Higuchi[3] hinwies. Nach mehrfachen vergeblichen Versuchen reagierte aber eine nur wenige Stunden alte Plazenta, in physiologischer Kochsalzlösung feinst zerrieben mit Amygdalin-Chloroformwasser innerhalb von 12 Stunden deutlich positiv. Bei Verwendung der beiden anderen Antiseptica konnte auch unter diesen Umständen das Emulsin nicht nachgewiesen werden.

Die Untersuchungen in dieser Richtung wurden jedoch — als zu weit führend — nur auf das Prinzipielle beschränkt. Immerhin läßt sich sagen, daß die angegebenen Mikroreaktionen bei der Ermittlung, welche Teile, respektive Organe bei den wirbellosen, meist kleinen Tieren das in Rede stehende Ferment enthalten, beziehungsweise bilden — einer Frage, die bisher aus technischen Gründen offenbleiben mußte — gute Dienste leisten könnte.

2. Lokalisierter mikrochemischer Nachweis von Emulsin.

Mit Recht weisen Molisch sowie Tunmann[4] auf die Unzulänglichkeit des bisher geübten lokalen mikrochemischen Nachweises von Emulsin hin. Die Gründe hierfür sollen an dieser Stelle nicht neuerdings angeführt werden.

Auch die eben besprochene Methode des eindeutigen qualitativen Emulsinnachweises ist zur Lokalisationsermittlung im Gewebe nicht anwendbar (vgl. die Ausführungen p. 38—39), selbst nicht bei Pflanzen, die ein durch Emulsin spaltbares Blausäureglukosid bereits enthalten.

---

[1] Werner Fischer, l. c. (1902) untersuchte nur frisch getötete Maikäfer, die stark Amygdalin spalteten; derselbe Autor konnte jedoch selbst in 150 Jahre alten Kellerasseln noch wirksame Fermente nachweisen!

[2] Vgl. M. Gonnermann, l. c. (1906), p. 183.

[3] S. Higuchi, l. c. (1909).

[4] O. Tunmann, Pflanzenmikrochemie, 1913, p. 431—433.

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

Bei dem so allgemeinen Vorkommen amygdalinspaltender Fermente hat aber auch die Frage nach ihrer Lokalisation einigermaßen an Bedeutung verloren. In der Mehrzahl der Fälle wird wohl das wirksame Emulsin dem fermentativen Apparat jeder einzelnen Zelle angehören und der früher fast ausschließlich studierte Rosaceentypus dürfte nur einen der möglichen Spezialfälle darstellen. — Bereits früher wurde die Ansicht vertreten, daß in allen jenen zahlreichen Pflanzen, wo eine stabile Blausäureverbindung (Glukosid) nicht faßbar ist, eine — im Leben getrennt gehaltene — Koexistenz von Emulsin und HCN-Glukosid in denselben Gewebszellen angenommen werden kann. An eine gewisse Lokalisation des Emulsins im Gewebe könnte nur bei jenen Pflanzen gedacht werden, aus denen Blausäureglukoside leicht zu gewinnen sind (Mandeltypus — schon kaum mehr *Prunus laurocerasus* [vgl. die Ergebnisse Peche's]), wenn auch in vielen Fällen (z. B. *Sambucus nigra*) bloß die geringe Aktivität und Wirksamkeit des spaltenden Fermentes dafür verantwortlich zu machen sein wird.

In einem Falle, bei *Prunus amygdalus* L. var. *amara* und einigen anderen Rosaceensamen (Apfel, Quitte) gelang ein gewissermaßen lokalisierter Nachweis der emulsinhaltigen Zellen mittels des Benzidin-Kupferacetatreagens.

Auf einen Tropfen des durch die Gegenwart einer fast gesättigten Benzidinacetatlösung stark viskosen Benzidinreagens wird ein ziemlich großer, nicht zu dünner Querschnitt einer bitteren Mandel möglichst zart aufgelegt, hierauf der Objektträger mit dem am Tropfen hängenden Schnitt über eine Glaskammer, die einen Tropfen Chloroform enthält, gestülpt. In kurzer Zeit läßt sich im hängenden Schnitt das Ausfallen blauer Flocken der Benzidinoxydationsverbindung, hervorgerufen durch die einsetzende HCN-Abspaltung, feststellen, und zwar in günstigen Fällen knapp um die Leitbündelquerschnitte beginnend (Perizykelzellen) und von hier aus konzentrisch in das amygdalinführende Parenchym fortschreitend, entsprechend der allmählichen Diffusion des Emulsins im viskosen Medium. Die Ansichten von Johannsen[1] und Guignard[2] über die Lokalisation des Emulsins in der bitteren Mandel können daher durch diese spezifische Emulsin- (respektive HCN-)Reaktion bestätigt werden.

Die Anwendbarkeit der Reaktion, deren richtiges Gelingen hauptsächlich vom Treffen physikalischer Nebenumstände abhängt, ist jedoch eine geringe. Sie wurde auch mit Querschnitten von Apfel- und Quittensamen mit ähnlichem Erfolge durchgeführt, doch schon bei *Prunus Laurocerasus* versagt sie völlig, da das für den Reaktionsverlauf so nötige Kupfersalz anscheinend durch den reichlich vorhandenen Gerbstoff abgefangen wird. Eine allgemein anwendbare Methode liegt demnach infolge der Empfindlichkeit des Benzidin-Kupferacetatreagens gegen verschiedene Pflanzenstoffe nicht vor; wegen der manchmal schönen Bilder, die an Schnitten von bitterer Mandel zu erzielen sind, sollte sie trotzdem erwähnt werden.

E. Zusammenfassung der Ergebnisse.

1. Abgesehen von den chemisch bisher analysierten Blausäureverbindungen (HCN-Glukoside) im Pflanzenreiche, die übersichtsweise in der Einleitung zusammengestellt wurden, ist besonders

[1] W. Johannsen, Sur la localisation de l'émulsine dans les amandes. Ann. des sciences nat. Bot., sér. VII, t. 6, p. 118.

[2] L. Guignard, Sur la localisation dans les plantes des principes, qui fournissent l'acid cyanhydrique. Compt. rend. 1890, Bd. 110, p. 477.

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

in der botanischen Literatur mehrfach eine »labile« oder »lockere« (quasi-freie) Blausäurebindung angenommen worden.

An Hand der betreffenden Arbeiten wurde gezeigt, daß das Auftreten dieser »lockeren Blausäurebindung« bei verfeinerter Methodik quantitativ immer geringer wird, aber nicht völlig zu vermeiden ist, und daß sich dieses Vorkommen in ungezwungener Weise durch die Annahme einer in der lebenden Zelle noch auseinandergehaltenen räumlichen Koexistenz von Blausäureglukosid und stark wirksamem Enzym (Emulsin) erklären läßt.

2. In der allgemeinen (technischen) Mikrochemie waren bisher zum Nachweis von HCN nur die Berlinerblauprobe, eventuell die Rhodanprobe direkt im Lösungstropfen angewendet. — Es wurden zwei weitere einfache mikrochemische Reaktionen auf Blausäure angegeben, mit 1% Silbernitrat, beziehungsweise mit Benzidin-Kupferacetat, die unter Benützung des niederen Siedepunktes von HCN (26° C.) in der Glaskammer mit den Reagentien im hängenden Tropfen bei Zimmertemperatur ausgeführt werden und trotzdem empfindlicher sind als die erwähnte Berlinerblauprobe.

3. Bei der Reaktion mit 1% Silbernitrat entsteht bei dieser Reaktionsanordnung krystallisiertes Silbercyanid (Nadeln, Ranken, Drusen), das sich eindeutig von Silberchlorid und Silberrhodanid auf mehrfache Weise unterscheiden läßt, am einfachsten durch Umkrystallisieren des Silbercyanids mit fast kochender 50%-HNO_3 unter Deckglas in feine Nadeln und Nadelbüscheln.

Die Empfindlichkeit der Reaktion beträgt 0·06 γ HCN in einem Tropfen.

Wie die Silberchloridkrystalle erweisen sich auch die Cyansilber-(und Rhodansilber-)Krystalle als »echt« färbbar mit verschiedenen organischen Farbstoffen. Aus rein praktischen Gründen wurde daher stets 1% $AgNO_3$ + Methylenblau als Reagens im hängenden Tropfen verwendet, um blau gefärbte AgCN-Krystalle zu erzielen.

4. Das Benzidin-Kupferacetatreagens (nach Pertusi) zeigt eine noch größere Empfindlichkeit (0·02 γ HCN), wurde jedoch, da nicht völlig eindeutig, nur zugleich mit $AgNO_3$ angewendet. Die chemische Natur der erzielten blauen Benzidinoxydationsverbindung (blaue Nadeln oder Körnchen) ist analog dem bekannten »Benzidinchromat« und »Benzidinferricyanid«.

5. Mittels beider Proben läßt sich in geringsten Mengen von (Wiener) Leuchtgas und im Tabakrauch (sogar noch in einem ausgeblasenen Zuge) Cyanwasserstoff eindeutig nachweisen. Die Reinheit der Luft ist demnach für die einwandfreie Ausführung dieser Reaktionen unerläßlich.

6. Zum rein qualitativen Nachweis von HCN in Pflanzenteilen (etwa vergleichbar der Mikrosublimationsmethodik) eignen

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

sich beide mikrochemischen Proben besonders dadurch, daß die stets erst durch Fermentation entstehende HCN sich summieren kann.

Die Fermentationszeit in der Glaskammer wurde sicherheitshalber stets auf 10 Stunden erstreckt, immer jedoch die HCN-Abspaltung durch Zusatz von etwas Chloroform beschleunigt und zugleich das Ganze steril erhalten.

7. An drei ausgearbeiteten Beispielen (*Ribes, Crataegus,* Araceen) wurde die Anwendbarkeit der mikrochemischen Methode speziell dargetan.

Es wurden dabei 12 *Ribes*-Arten, 5 *Crataegus*-Arten, 14 Araceen und 10 Arten aus verschiedenen Pflanzenfamilien, also im ganzen 41 neue Blausäurepflanzen gefunden und die quantitative Abnahme der in den jungen Organen dieser Pflanzen reichlich auftretenden Blausäureverbindung im Laufe einer Vegetationsperiode stichprobenweise verfolgt.

8. Der lokalisierte Nachweis von HCN im Gewebe bietet große methodische Schwierigkeiten, gelingt deshalb bei der Mehrzahl der Pflanzen nicht; in besonders günstigen Fällen jedoch sind die bekannten Reaktionen von Treub (Berlinerblau-Bürstenverfahren) und Peche (Mercuronitrat) anwendbar.

9. Der Versuch des direkten mikrochemischen Nachweises eines HCN-Glukosides (Amygdalin) führte zu keinem brauchbaren Ergebnisse.

10. Auch zum eindeutigen, qualitativen mikrochemischen Nachweis von Emulsin — im Sinne eines Gruppenbegriffes aufgefaßt — lassen sich die beiden Blausäurereaktionen mit Silbernitrat und Benzidin heranziehen.

Die fein zerriebene, respektive gepulverte Substanz (oder Schnitte) wird in einer Mikroglaskammer mit fixem Boden mit 5% Amygdalinlösung, die zudem ein Antiseptikum (Toluolwasser, Chloroformwasser, 2 bis 4% Natriumfluorid) enthält, angerührt und höchstens 24 Stunden der Fermentation bei Zimmertemperatur überlassen.

In $1^1/_2$ bis 8 Stunden ist bereits abgespaltene HCN in den hängenden Tropfen bei Anwesenheit von Emulsin nachweisbar.

11. Dieser mikrochemische Emulsinnachweis bietet — abgesehen von seiner Empfindlichkeit — den Vorteil, die Wirksamkeit zweier Emulsine, sowie die Intensität der eingetretenen Amygdalinspaltung ohne Störung der Reaktion in einem relativen Maßstabe vergleichen zu können.

12. In Anwendung der Probe auf pflanzliche Objekte bestätigte sich die ungemein weite Verbreitung des Fermentes, selbst bei bisher (makrochemisch) als emulsinfrei angegebenen Arten.

Auch bei tierischen Objekten (Maikäfer, Rinderleber) gelang die mikrochemische Reaktion; sie könnte zur Ermittlung, in welchen

Download from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentrum

Organen das amygdalinspaltende Ferment bei den wirbellosen, meist kleinen Tieren enthalten ist, mit Vorteil angewendet werden.

13. Ein lokalisierter spezifischer Nachweis des Emulsins im Gewebe gelingt in allgemeiner Weise nicht.

Bei der Mehrzahl der Pflanzen dürfte jedoch das Emulsin der Fermentausrüstung jeder einzelnen Zelle angehören und der Rosaceentypus (mit spezifischen Emulsinzellen) nur einen Spezialfall darstellen.

14. Die Anschauungen Johannsen's und Guignard's über die Lokalisation des Emulsins in der bitteren Mandel und in Samen verwandter Pflanzen konnte durch eine bei diesen Objekten gelingende spezifische Emulsinreaktion bestätigt werden.

Am Schlusse möchte ich noch Herrn Hofrat Prof. Dr. H. Molisch, meinem hochverehrten Lehrer, für die Anregung zur Bearbeitung dieses Themas, sowie für das stete Interesse, das er meinen diesbezüglichen, einjährigen Untersuchungen entgegengebracht hat, von Herzen danken. Auch Herrn Assistenten Dr. G. Klein danke ich bestens für seine Unterstützung, Herrn Assistenten Josef Kisser vielmals für die Anfertigung der Textfigur.